



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANESSA BARBOSA BOBEK

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS DE
AMIDO DE MILHO CONTENDO EXTRATO BRUTO DE *Baccharis*
*eriodlada*DC.(ASTERACEAE)

CURITIBA

2019

VANESSA BARBOSA BOBEK

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS DE
AMIDO DE MILHO CONTENDO EXTRATO BRUTO DE *Baccharis erioclada*
DC. (ASTERACEAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores:

Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel

Profa. Dra. Josiane de Fátima Padilha de Paula

CURITIBA

2019

Bobek, Vanessa Barbosa

Desenvolvimento e caracterização de filmes poliméricos de amido de milho contendo extrato bruto de *Bacchariserioclada* DC. (Asteraceae) [recurso eletrônico] / Vanessa Barbosa Bobek – Curitiba, 2019.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientador: Professor Dr. Obdúlio Gomes Miguel

Coorientadora: Professora Dra. Josiane de Fátima Padilha de Paula

1. *Baccharis*. 2. Inflamação. 3. Filmes biodegradáveis. I. Miguel, Obdúlio Gomes. II. Paula, Josiane de Fátima Padilha de. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 583.55



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÉUTICAS - 40001016042P8


TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **VANESSA BARBOSA BOBEK** intitulada: **DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS DE AMIDO DE MILHO CONTENDO EXTRATO BRUTO DE *Baccharis eriodictya* DC. (ASTERACEAE)**

, sob orientação do Prof. Dr. **OBDÚLIO GOMES MIGUEL**, que após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Setembro de 2019.


OBÚLIO GOMES MIGUEL
Presidente da Banca Examinadora


SANDRA MARIA WARUMBY ZANIN
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


JANE MANFRON BUDEL
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)


VINICIUS BEDNARCZUK DE OLIVEIRA
Avaliador Externo (CENTRO UNIVERSITÁRIO CAMPOS DE ANDRADE)


CAMILA FREITAS DE OLIVEIRA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE)



Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas



Curitiba, 19 de novembro de 2019.

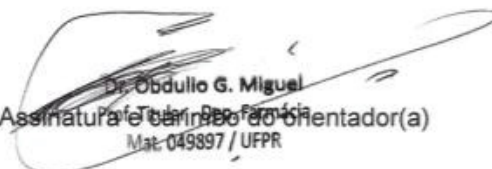
Ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,

Venho por meio desta, declarar que a discente VANESSA BARBOSA BOBEK, realizou as correções solicitadas pela banca examinadora. Sendo assim, autorizo a entrega da versão definitiva da tese de doutorado, e solicito sua homologação por este Colegiado.

Ainda, atendendo as normas internas do Programa PGCF e a resolução N° 32/17-CEPE, encaminho a cópia do artigo Qualis B2 área Farmácia/CAPES aceito, relacionado ao projeto de doutorado.

Sem mais para o presente momento, subscrevo-me.

Atenciosamente,


Dr. Abdullo G. Miguel
Assinatura e Carimbo do Orientador(a)
Mat. 049897 / UFPR

AGRADECIMENTOS

Ao Divino Criador pela proteção durante minhas inúmeras viagens à Curitiba e por ter proporcionado infinitas bênçãos ao longo dessa jornada, sempre me colocando nos lugares certos e com as pessoas certas.

Ao Celso Bobek por toda paciência e amor dedicados durante esse período tão trabalhoso. Obrigada por ter me apoiado nessa jornada e pela coleta do material botânico.

Aos meus pais pelo amor e apoio para que esta tese fosse concluída.

Ao meu orientador Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel por ter aceitado o desafio de me orientar. Obrigada pela confiança e pela paciência.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Josiane de Fátima Padilha de Paula pela imensa colaboração, dedicação, paciência e bom humor constante. Gratidão por ter me acolhido em seus laboratórios de pesquisa na UEPG e por sempre me integrar ao seu grupo de pesquisa com tanto carinho.

À Profa Dra. Sandra Maria Zanin pela amizade, conversas agradáveis, preciosos ensinamentos, acolhimento e muitas risadas. Obrigada por ser sempre tão amável comigo.

À Profa Dra. Jane Manfron Budel pelo apoio e amizade sincera. Obrigada por sempre me animar nos momentos difíceis.

À Profa. Dra. Tomoe Nakashima pela amizade, apoio e pelos preciosos conselhos.

À Profa. Dra. Marilis D. Miguel por toda a força prestada para que eu concluísse essa tese. Você foi fundamental!!!

Ao prof. Dr. Flávio Beltrame pelas valiosas dicas que tanto contribuíram nesta tese. Gratidão pelo carinho e pelas respostas quase imediatas de e-mail.

À Profa. Msc. Carmen Antonia Ito pela imensa ajuda nas análises microbiológicas. Agradeço os conselhos e a amizade que levarei por toda a minha vida.

À minha querida amiga Maria da Graça Toledo pelo incentivo, carinho e pela gigantesca colaboração na validação analítica.

Às minhas amadas amigas: Amanda Martinez Lyra, um dos grandes presentes deste doutorado. Obrigada pela parceria e por ter me ajudado nas infinitas vezes que precisei independente da hora que fosse. À querida Camila Freitas de Oliveira, pela parceria e acolhimento na sua casa durante o longo período de análises na UFPR. Agradeço de coração à Christiane Aparecida Gonçalves e Luiza Scholtz Cruz por todo o carinho e apoio. A amizade e ajuda de cada uma de vocês foram fundamentais para a realização desta tese, bem como imprescindíveis para tornarem minha vida mais leve e feliz!

Ao querido amigo Fernando Cesar Martins Betim pela enorme parceria e pelos momentos de descontração que foram fundamentais para minha sanidade mental. Obrigada por sempre me colocar no eixo!

Ao Henrique Assis Betim, excelente aluno de iniciação científica pela dedicação e pela prontidão em me ajudar sempre. Você foi incrível!

À amiga Isabel Migliori pela amizade, parceria e colaboração. Obrigada por sempre me acalmar nos dias mais turbulentos.

Aos colegas do grupo de pesquisa de Fitoquímica da UFPR: Amanda Urban, Angela Maria de Souza, Larissa Gatto, Katlin Suelen Rech, Carol Damasceno.

Ao Dr. Vinicius Bednarczuk de Oliveira e Dra. Beatriz Hirota pelas contribuições no exame de qualificação desta tese.

À querida Dra. Flávia Lada Degaut Pontes pela ajuda valiosa na validação analítica e contribuição no exame de qualificação.

Aos colegas do grupo de pesquisa do Laboratório de Produção de medicamentos da UEPG: Barbara Justus, Daniele Fardin, Natalia, Joel, Vanessa Von Muller, Rosana Rosa, Robson Novak.

Às colegas Juliane Nadal Dias Swiech e Daniela Gaspar do Folquitto pelas contribuições neste trabalho e pelas inúmeras caronas à Curitiba.

À farmacêutica do Laboratório de Produção de Medicamentos da UEPG (LAPMED) Dra. Traudi Klein pelas inúmeras idéias trocadas durante todo esse período.

À profa. Dra. Rosi Zanoni da Silva pela ajuda dispensada durante todo o período deste doutorado.

Às técnicas dos laboratórios da UEPG de farmacognosia Luciane Mendes Monteiro e do laboratório de farmacotécnica Elizabete Munhoz. A ajuda de vocês foi fundamental para que tudo desse certo.

Ao Dr. Milton D. Michel, do departamento de Engenharia de Materiais pela ajuda com os ensaios mecânicos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade. Agradeço em especial ao secretário Jean Godoy pela prontidão em me ajudar sempre.

Ao complexo de laboratórios multiusuários do CIPP e do SEBISA pelas análises.

À CAPES pelo suporte financeiro.

*Sempre que houver alternativas, tenha cuidado. Não opte
pelo conveniente,
pelo confortável,
pelo respeitável.
pelo socialmente aceitável,
pelo honroso.*

OPTE PELO QUE FAZ O SEU CORAÇÃO VIBRAR.

*Opte pelo que gostaria de fazer,
APESAR DE TODAS AS CONSEQUÊNCIAS.*

Osho

ENTREGO

ACEITO

CONFIO

AGRADEÇO

Prof. Hermógenes

RESUMO

O uso em excesso de anti-inflamatórios pode comprometer a saúde da população. Sendo assim, surge a necessidade da busca por novas opções de tratamentos. Composições poliméricas podem ser utilizadas para o tratamento tópico de inflamações. O desenvolvimento de filmes poliméricos que possam ser aplicados como coadjuvantes na inflamação, contribui, de maneira eficaz para a redução da injúria celular. O gênero *Baccharis* tem sido alvo de muitos estudos por apresentar atividades biológicas promissoras como anti-inflamatória, antioxidante, analgésica entre outras. A espécie *B. erioclada* DC. conhecida popularmente como “vassoura-lageana”, é um arbusto amplamente encontrado no Sul do Brasil, porém com escassez de estudos sobre sua fitoquímica ou atividades biológicas. No presente trabalho, a composição química desta espécie foi investigada, bem como foi realizada atividades antioxidante, antimicrobiana e a verificação da toxicidade do extrato bruto, frações e óleo essencial. Foram desenvolvidos e caracterizados filmes poliméricos de amido de milho para uso tópico impregnados com extrato bruto etanólico de *B. erioclada*. Para isso, partes aéreas secas foram submetidas à análise fitoquímica, na qual foi detectada a presença de flavonoides, taninos, antraquinonas entre outros metabólitos. O extrato bruto foi obtido por maceração e o óleo essencial extraído por hidrodestilação. Decorrido o período de maceração, uma parte do extrato bruto foi seco em *spray dryer* para a incorporação no filme polimérico. Outro extrato bruto foi preparado pela mesma técnica e rotaevaporado para partição com solventes de polaridade crescente para obter as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanólica. Durante o particionamento ocorreu a precipitação de um composto, a flavona hispidulina a qual foi identificada por RMN. Os ensaios antioxidantes indicaram boa capacidade antioxidante, com destaque do extrato bruto que apresentou atividade de 56% sendo superior ao padrão utilizado BHT. No teste de Redução do Radical DPPH o extrato bruto apresentou IC₅₀= 127 (µg/mL). O resultado obtido para os testes de poder de redução e capacidade antioxidante total foi de 61,71% e 51,13% respectivamente. Através de análises cromatográficas, foi realizada a quantificação da hispidulina no extrato bruto bem como, o desenvolvimento e a validação analítica. O método analítico desenvolvido e validado neste trabalho demonstrou ser adequado para a quantificação do flavonoide. Os filmes poliméricos foram caracterizados por meio de técnicas como Microscopia Eletrônica de Varredura por Efeito de Campo e Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier. Ensaio de tração foram realizados para avaliar as propriedades mecânicas. Foram determinados ainda, o grau de porosidade, taxa de transmissão de vapor de água e potencial antimicrobiano. Os resultados não demonstraram diferenças significativas entre os filmes inertes e os que possuíam extrato bruto na formulação. Os filmes apresentaram-se como uma matriz polimérica homogênea, com boa flexibilidade e características semi-oclusivas. Os resultados obtidos demonstram o potencial dos filmes obtidos com poli-lisina como anti-inflamatório tópico.

Palavras-chave: *Baccharis*, inflamação, filmes biodegradáveis.

ABSTRACT

Excessive use of anti-inflammatory drugs may compromise the health of the population. Therefore, there is a need to search for new treatment options using new drugs and safer formulations. The development of polymeric films that can be used as adjuvants in inflammation effectively contributes to the reduction of cell injury. The genus *Baccharis* has been the target of many studies for presenting promising biological activities such as anti-inflammatory, antioxidant, analgesic among others. The species *B. erioclada* DC. Popularly known as "vassoura-lageana", it is a shrub widely found in southern Brazil, but with a lack of studies on its phytochemistry or biological activities. In the present work, the chemical composition of this species was investigated, as well as antioxidant, antimicrobial activities and toxicity verification of crude extract, fractions and essential oil. Topical corn polymeric starch films impregnated with ethanolic crude extract of *B. erioclada* were developed and characterized. For this, dry aerial parts were submitted to phytochemical analysis, which detected the presence of flavonoids, tannins, anthraquinones among other metabolites. The crude extract was obtained by maceration and the essential oil extracted by hydrodistillation. After the maceration period, part of the crude extract was spray dried for incorporation into the polymeric film. Another crude extract was prepared by the same technique and rotated to partition with increasing polarity solvents to obtain the hexane, chloroform, ethyl acetate and methanolic fractions. During partitioning, a compound precipitated, the flavone hispidulin which was identified by RMN. The antioxidant assays indicated good antioxidant capacity, with emphasis on the crude extract which showed 56% activity being superior to the standard used BHT. In the DPPH Radical Reduction test the crude extract presented $IC_{50} = 127$ ($\mu\text{g} / \text{mL}$). The results obtained for the tests of reduction power and total antioxidant capacity were 61.71% and 51.13%, respectively. Through chromatographic analysis, the quantification of hispidulin in the crude extract was performed, as well as the development and analytical validation. The analytical method developed and validated in this work proved to be suitable for flavonoid quantification. The polymeric films were characterized by techniques such as Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Tensile tests were performed to evaluate the mechanical properties. The degree of porosity, water vapor transmission rate and antimicrobial potential were also determined. The results showed no significant differences between inert films and those with raw extract in the formulation. The films presented themselves as a homogeneous polymeric matrix, with good flexibility and semi-occlusive characteristics. The results show the potential of films obtained with polylysine as topical anti-inflammatory.

Key words: *Baccharis*, inflammation, biodegradable films.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESQUEMA QUE ILUSTRA AS ROTAS DE PERMEAÇÃO DO FÁRMACO ATRAVÉS DO ESTRATO CÓRNEO E DA MATRIZ LIPÍDICA	26
FIGURA 2 - ESTRUTURA DO AMIDO.....	29
QUADRO 1 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES DE <i>Baccharis</i>	37
FIGURA 3 - RAMOS VEGETATIVOS E REPRODUTIVOS DE <i>B. erioclada</i> DC.	42
FIGURA 4-FLUXOGRAMA DE DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DE MATERIAL E MÉTODOS.....	45
FIGURA 5 - CURVAS DE TG/TGA DE <i>B. erioclada</i> PULVERIZADA.....	69
FIGURA 6 - CURVA DE DSC DE <i>B. erioclada</i> PULVERIZADA.....	70
FIGURA 7 - ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO EXTRATO BRUTO EM FEG .	72
FIGURA 8 - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H (600 MHZ, CD ₃ OD) DA FRAÇÃOACETATO DE ETILA DE <i>B. erioclada</i>	75
FIGURA 9 - AMPLIAÇÃO DE ESPECTRO DE RMN DE ¹ H	75
FIGURA 10 - ESTRUTURA QUÍMICA DA FLAVONA HISPIDULINA	77
FIGURA 11 - ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DE <i>B. erioclada</i>	79
FIGURA 12 - CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO OBTIDO DE <i>B. erioclada</i>	91
FIGURA 13- CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE HISPIDULINA.....	91
FIGURA 14 - ESPECTRO DE UVDO PADRÃO DE HISPIDULINA E DO EB....	92

FIGURA 15–CROMATOGRAMAS E ESPECTRO DE UV REPRESENTANDO A PUREZA DOS PICOS PARA O ENSAIO DE SELETIVIDADE	94
FIGURA 16 - GRÁFICO DA LINEARIDADE DO PADRÃO HISPIDULINA.....	96
FIGURA 17 - ASPECTO DO FILME INERTE.....	100
FIGURA 18 - ASPECTO DO FILME CONTENDO EXTRATO	100
FIGURA 19 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR EMISSÃO DE CAMPO DA SUPERFÍCIE DOS FILMES INERTES	103
FIGURA 20 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR EMISSÃO DE CAMPO DA FRATURA DOS FILMES INERTES	104
FIGURA 21 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR EMISSÃO DE CAMPO DA SUPERFÍCIE DOS FILMES COM EXTRATO	105
FIGURA 22 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR EMISSÃO DE CAMPO DA FRATURA DOS FILMES COM EXTRATO.....	106
FIGURA 23 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DAS FORMULAÇÕES F1 I E F1 3%	107
FIGURA 24- ESPECTRO DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DAS FORMULAÇÕES F2 I E F2 3%	108
FIGURA 25 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DAS FORMULAÇÕES F3 I E F3 3%	108
FIGURA 26 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DAS FORMULAÇÕES F4 I E F4 3%	109

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - POSIÇÃO SISTEMÁTICA DAS ESPÉCIES DE <i>Baccharis</i>	42
TABELA 2 - PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS PARA O <i>FINGERPRINT</i> DO EXTRATO BRUTO POR CLAE	60
TABELA 3 - CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NA AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE	61
TABELA 4 - CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS TRABALHADAS NO PARÂMETRO DE EFEITO MATRIZ.....	62
TABELA 5 - PREPARO DE AMOSTRAS PARA O ENSAIO DE EXATIDÃO	63
TABELA 6 - CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DA ROBUSTEZ.....	64
TABELA 7 - CONCENTRAÇÕES DOS POLÍMEROS EMPREGADOS NAS FORMULAÇÕES DOS FILMES	64
TABELA 8 - DETERMINAÇÃO DE UMIDADE E CINZAS ENCONTRADAS PARA <i>Baccharis erioclada</i> DC	68
TABELA 9 - RESULTADO DA PESQUISA FITOQUÍMICA.....	71
TABELA 10 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES	74
TABELA 11 - DADOS DE RMN de ¹ H E ¹³ C da FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE <i>B. erioclada</i>	76
TABELA 12 - COMPOSTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS NA ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL DAS PARTES AÉREAS DE <i>B. erioclada</i>	80
TABELA 13 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>B. erioclada</i>	83
TABELA 14 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE <i>B. erioclada</i> POR DIFERENTES MÉTODOS.....	85

TABELA 15 - QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS NO EXTRATO BRUTO DE <i>B. erioclada</i> (mg/g)	89
TABELA 16 - RESULTADOS DO ENSAIO DE LINEARIDADE.....	95
TABELA 17 - RESULTADOS DE ANOVA PARA LINEARIDADE DO MÉTODO.....	96
TABELA 18 - RESUMO DOS PARÂMETROS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA HISPIDULINA.....	97
TABELA 19 - ÁREAS DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS DA AMOSTRA OBTIDAS A PARTIR DAS ANÁLISES DO PADRÃO E AMOSTRA COM ADIÇÃO DE PADRÃO.....	97
TABELA 20 - DADOS DA REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.	98
TABELA 21 - RESULTADOS DO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO OBTIDOS PELO MÉTODO DE ADIÇÃO DE PADRÃO	98
TABELA 22 - RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ	99
TABELA 23 - ESPESSURA DOS FILMES DE AMIDO DE MILHO INERTES E COM EXTRATO BRUTO DE <i>B. erioclada</i> DC.....	101
TABELA 24 - PRINCIPAIS BANDAS ENCONTRADAS NOS ESPECTROS IVTF DOS FILMES INERTES E COM EXTRATO.....	109
TABELA 25 - PROPRIEDADES MECÂNICAS DOS FILMES OBTIDOS	111
TABELA 26 - VALORES DE TTVA PARA OS FILMES DE AMIDO	113

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	<i>American type culture collection</i>
Abs –	Absorbância
ANOVA –	Análise de variância
BHT –	Butil hidróxidotolueno
CCD –	Cromatografia em Camada Delgada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL50 –	Concentração letal 50%
CLAE/DAD -	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector Diodo
CLSI -	<i>Clinical Laboratory Standarts Institute</i>
CG/EM -	Cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas
DMSO –	Dimetilsulfóxido
DP –	Desvio Padrão
DPPH –	2,2- difenil-1-picril-hidrazila
DSC -	Calorimetria exploratória diferencial
EAG –	Equivalente de ácido gálico
EB -	Extrato Bruto
ε-PLL -	ε-Polilisina
FAE –	Fração acetato de etila
FCL –	Fração clorofórmio
FM–	Fração metanólica
F1 I -	Formulação 1 inerte contendo: 20mL de amido; 20mL de ε-PLL; 4 mL glicerol; 0,5 ácido acético
F2 I -	Formulação 2 inerte contendo: 30mL de amido; 10mL de ε-PLL; 4 mL glicerol; 0,5 ácido acético
F3 I -	Formulação 3 inerte contendo: 20mL de amido; 4 mL glicerol; 0,5 ácido acético
F4 I -	Formulação 4 inerte contendo: 30mL de amido; 4 mL

	glicerol; 0,5 ácido acético
F1 % -	Formulação 1 contendo extrato a 3%; 20mL de amido; 20mL de ϵ -PLL; 4 mL glicerol; 0,5 ácido acético
F2 3% -	Formulação 2 contendo extrato a 3%; 30mL de amido; 10mL de ϵ -PLL; 4 mL glicerol; 0,5 ácido acético
F3 3% -	Formulação 3 contendo extrato a 3%; 20mL de amido; 4 mL glicerol; 0,5 ácido acético
F4 3% -	Formulação 4 contendo extrato a 3%; 30mL de amido; 4 mL glicerol; 0,5 ácido acético
MEV –	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT -	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2-5-difenil-2il-tetrazólico
OE -	Óleo essencial
P -	Porosidade
PBS –	Tampão fosfato-salino
pH -	Potencial Hidrogeniônico
QSP –	Quantidade Suficiente Para
RMN –	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ^1H –	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SDS –	Dodecil sulfato de sódio
SEM – FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (<i>Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy</i>)
SQR -	Substância química de referência
TGA/TG -	Análise termogravimétrica
TTVA -	Taxa de transmissão de vapor de água
UFC -	Unidade formadora de colônia
Y -	Módulo de Young
Δm -	Variação de massa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 REVISÃO DA LITERATURA	25
3.1 PELE E VIA DE ADMINISTRAÇÃO TÓPICA	25
3.2 POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS	27
3.2.1 AMIDO	28
3.2.1.1 Filmes a base de amido	31
3.2.1.2 Propriedades dos filmes de amido	32
3.2.1.2.1 Propriedades mecânicas	32
3.2.1.2.2 Propriedades de barreira	33
3.2.1.2.3 Espessura	34
3.3 Usos de filmes poliméricos com ativos vegetais	34
3.4 GÊNERO <i>Baccharis</i>	35
3.4.1 Metabólitos de interesse no gênero <i>Baccharis</i>	38
3.4.1.1 Flavonoides	38
3.4.1.1.1 Atividade anti-inflamatória dos flavonoides	39
3.4.1.1.2 Atividade antioxidante dos flavonoides	41
3.4.2 <i>Bacharis erioclada</i> DC.	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 MATERIAL BOTÂNICO	44
4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MATERIAL VEGETAL	45
4.2.1 Determinação de umidade	45
4.2.2 Determinação de cinzas totais	46
4.2.3 Estudo termoanalítico	46
4.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA	47
4.3.1 Pesquisa de alcaloides	47
4.3.2 Pesquisa de Antraderivados	47
4.3.2.1 Pesquisa de antraderivados livres	47
4.3.2.2 Pesquisa de O-heterósidos antraquinônicos	47
4.3.2.3 Pesquisa de C-heterósidos antraquinônicos	48

4.3.3 Pesquisa de cumarinas	48
4.3.4 Pesquisa de flavonoides.....	48
4.3.4.1 Reação de Shinoda	49
4.3.4.2 Reação com cloreto de alumínio (AlCl ₃).....	49
4.3.4.3 Hidróxido alcalino	49
4.3.4.4 HCl concentrado.....	49
4.3.4.5 Pesquisa de Taubouk.....	49
4.3.4.6 Pesquisa de PEW.....	50
4.3.5 Pesquisa de saponinas	50
4.3.6 Pesquisa de taninos	50
4.3.6.1 Reação com a gelatina.....	50
4.3.6.2 Reação com acetato de cobre.....	51
4.3.6.3 Reação com acetato de chumbo	51
4.3.7 Pesquisa de taninos hidrolisáveis.....	51
4.3.7.1 Reação com acetato ácido de chumbo	51
4.3.7.2 Reação com FeCl ₃	51
4.3.8 Pesquisa de taninos condensados	51
4.3.8.1 Água de bromo	51
4.3.9 Teste para esteroides.....	51
4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES.....	52
4.4.1 Obtenção dos extratos brutos	52
4.4.2 Determinação do teor de sólidos	52
4.4.3 Fracionamento do extrato bruto	53
4.5 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL	53
4.5.1 Extração do óleo essencial.....	53
4.5.2 Identificação e quantificação dos compostos voláteis do óleo essencial...	54
4.6 ESTUDO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE <i>Baccharis erioclada</i> DC.....	54
4.6.1 Atividade tóxica em <i>Artemia salina</i> Leach	54
4.6.2 Avaliação da atividade antimicrobiana	55
4.6.2.1 Microrganismos	55
4.6.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição	55
4.6.3 Ensaios antioxidantes.....	56
4.6.3.1 Método da redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)	56

4.6.3.2 Poder de redução (Azul da Prússia).....	57
4.6.3.3 Método para a determinação das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	57
4.6.3.4 Capacidade antioxidante total (Fosfomolibidênio).....	58
4.7 DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS e FLAVONÓIDES TOTAIS	58
4.7.1 Doseamento de polifenóis	58
4.7.2 Doseamento de flavonoides totais.....	59
4.8 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	59
4.8.1 Desenvolvimento e validação do método analítico por CLAE	60
4.8.2 Seletividade	61
4.8.3 Linearidade e faixa de trabalho	61
4.8.4 Efeito matriz	62
4.8.5 Precisão	62
4.8.6 Exatidão	63
4.8.6 Limite de detecção e quantificação	63
4.8.7 Robustez	63
4.9 DESENVOLVIMENTO DOS FILMES DE AMIDO	64
4.9.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES POLIMÉRICOS	64
4.9.2.1 Análise subjetiva.....	64
4.9.2.2 Análise por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FEG).....	65
4.9.2.3 Avaliação por espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (IVTF)	65
4.9.2.4 Espessura	65
4.9.2.5 Caracterização das propriedades mecânicas: teste tensão de ruptura dos filmes	66
4.9.2.6 Determinação da taxa de transmissão de vapor de água	66
4.9.2.7 Porosidade	67
4.9.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do filme polimérico.....	67
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA DROGA VEGETAL.....	68
5.1.1 Determinação de umidade e cinzas	68
5.1.2 Estudo termoanalítico.....	69
5.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	71

5.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES.....	72
5.3.1 Obtenção do extrato bruto.....	72
5.3.2 Determinação do teor de sólidos.....	73
5.3.3 Rendimento das frações.....	74
5.3.4 IDENTIFICAÇÃO DO PRECIPITADO	75
5.4 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL	77
5.5 ESTUDO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE <i>Baccharis erioclada</i> DC.....	82
5.5.1 Atividade tóxica em <i>Artemia salina</i> Leach.....	82
5.5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana	83
5.5.3 Ensaio antioxidante.....	84
5.6 Doseamento de fenólicos e flavonoides totais	89
5.7 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	90
5.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE	93
5.8.1 Seletividade.....	93
5.8.2 Linearidade e faixa de trabalho	95
5.8.3 Efeito matriz	97
5.8.4 Precisão	97
5.8.5 Exatidão	98
5.8.6 Robustez	98
5.9 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE AMIDO ...	99
5.9.1 Análise subjetiva.....	99
5.9.2 Espessura	101
5.9.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	102
5.9.3 Avaliação por espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (IVTF).....	107
5.9.4 Caracterização das propriedades mecânicas: teste tensão de ruptura dos filmes.....	110
5.9.5 Determinação da porosidade e taxa de transmissão de vapor de água ...	112
5.9.6 Avaliação da atividade antimicrobiana	113
CONSIDERAÇÕES FINAIS	114
REFERÊNCIAS.....	116
ANEXOS	138
ANEXO 1 - AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO	139

ANEXO 2– CARTA DE ACEITE DO ARTIGO	140
--	-----

1INTRODUÇÃO

Utilizadas por grande parte da população como uma alternativa de cura de doença e melhora de sintomas, as plantas medicinais são responsáveis pela melhora na qualidade de vida, quando utilizadas de forma correta. Dessa forma, os insumos vegetais tornam-se uma terapia adicional ao tratamento alopático (TAUFNER; FERRAÇO; RIBEIRO, 2006).

No Brasil, os estudos realizados com plantas medicinais apresentam crescimento constante devido à rica biodiversidade, favorecendo a valorização das espécies vegetais nativas e consequentemente contribui com propostas para a preservação e o uso sustentável de reservas biológicas (LEWINSOHN; PRADO, 2002; CARNEIRO et al., 2014).

Dentre os gêneros que se destacam pelo seu uso medicinal, encontra-se *Baccharis* L. Este gênero é formado por cerca de 435 espécies, sendo distribuídas principalmente na América do Sul (FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO).

No gênero *Baccharis*, os metabólitos secundários mais presentes são óleos essenciais, os flavonoides e demais compostos fenólicos, sendo assim designados como marcadores quimiotaxonômicos para a família Asteraceae (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). Ao apresentar compostos fenólicos como marcadores, a espécie vegetal torna-se ainda mais interessante para estudo, pois, sugere-se que a planta apresente atividades biológicas promissoras como poder antioxidante e anti-inflamatório.

A preocupação com o tratamento da inflamação está presente na história desde a antiguidade. Destaca-se no tratamento de quadros inflamatórios o uso de anti-inflamatórios esteroidais e os anti-inflamatórios não-esteroidais (COUTINHO et al., 2009; BERTOLDI et al., 2014).

O uso abusivo de medicamentos anti-inflamatórios traz riscos à saúde da população, pois, sem acompanhamento e orientação adequados podem surgir efeitos adversos e agravar o quadro do paciente (BORGES, 2013). Neste sentido, é de fundamental importância a pesquisa por novas substâncias que possam ser incorporadas às formas farmacêuticas já existentes ou que venham fazer parte de novas formulações com a finalidade de tratar inflamações.

Os polímeros biodegradáveis têm despertado o interesse em diversas áreas da pesquisa científica. A substituição dos polímeros sintéticos pelos polímeros naturais apresenta como grande vantagem redução dos custos e a rápida degradação que eles possuem em relação aos sintéticos (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006). O desenvolvimento de filmes poliméricos a partir de polímeros naturais oferece um leque de aplicações: na área farmacêutica, biomédica, na indústria de cosméticos, alimentícia entre outras.

Dentre os diversos polímeros naturais encontra-se o amido, um polissacarídeo biodegradável muito utilizado na indústria de medicamentos, alimentos e cosméticos devido à sua atoxicidade, baixo custo e fácil disponibilidade (RANA et al., 2011). A aplicação do amido como matéria-prima na produção de filmes poliméricos se baseia nas propriedades químicas, físicas e funcionais da amilose para formar géis e na sua capacidade para formar filmes (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

Considerando a escassez de informações na literatura sobre a aplicação de extratos da espécie *Baccharis erioclada* DC. em filmes poliméricos biodegradáveis, torna-se viável e necessária a realização desta pesquisa que tem por finalidade desenvolver e caracterizar um filme polimérico a base de amido de milho com potencial bioativo para auxiliar no processo anti-inflamatório, de custo acessível e fácil aplicabilidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo fitoquímico, desenvolver e caracterizar um filme de amido de milho impregnado com extrato bruto etanólico de partes aéreas de *Bacchariserioclada* DC.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato bruto das partes aéreas floridas de *B. erioclada* por maceração com etanol PA.;
- Realizar o fracionamento do extrato bruto;
- Obter o óleo essencial das partes aéreas por hidrodestilação;
- Identificar os compostos químicos presentes no óleo essencial por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS);
- Avaliar a toxicidade dos extratos, frações e óleo essencial frente à *Artemia salina*;
- Avaliar o potencial antimicrobiano do EB, frações, OE e filmes;
- Investigar a atividade antioxidante do extrato bruto, frações e óleo essencial por diferentes métodos;
- Quantificar espectrofotometricamente os compostos fenólicos totais e flavonoides totais;
- Detectar substâncias presentes no extrato bruto através da cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE- DAD);
- Desenvolver e validar um método por CLAE-DAD para quantificação de metabólito presente no extrato bruto;
- Propor e analisar diferentes formulações de filmes de amido;
- Caracterizar os filmes por meio de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) e microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FEG);
- Avaliar as propriedades mecânicas dos filmes obtidos por meio de ensaios de tração;

- Determinar a taxa de transmissão de vapor de água (TTVA) e porosidade (P);
- Determinar a atividade antimicrobiada dos filmes poliméricos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PELE E VIA DE ADMINISTRAÇÃO TÓPICA

A pele é o maior órgão do corpo humano constituindo aproximadamente 16% do peso corporal. Juntamente com seus anexos: glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas, folículos pilosos e unhas compõe o sistema tegumentar (GARTNER; HIATT, 2007). É constituída de três camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A epiderme é formada principalmente por queratinócitos e protege o organismo contra a desidratação e o atrito. A derme é constituída por fibroblastos e pela matriz extracelular. Subjacente a derme, encontra-se a hipoderme, uma região bem vascularizada responsável pelo isolamento térmico e a absorção de choques mecânicos (GOSAIN; DIPIETRO, 2004; BIELEFELD; AMINIK, ALMAN, 2013).

Além de atuar como uma barreira de proteção, a pele realiza ainda a absorção de radiação ultravioleta dos raios solares para síntese de vitamina D, e também a atividade sensorial (GARTNER; HIATT, 2007; TRES; KIERSZENBAUM, 2012).

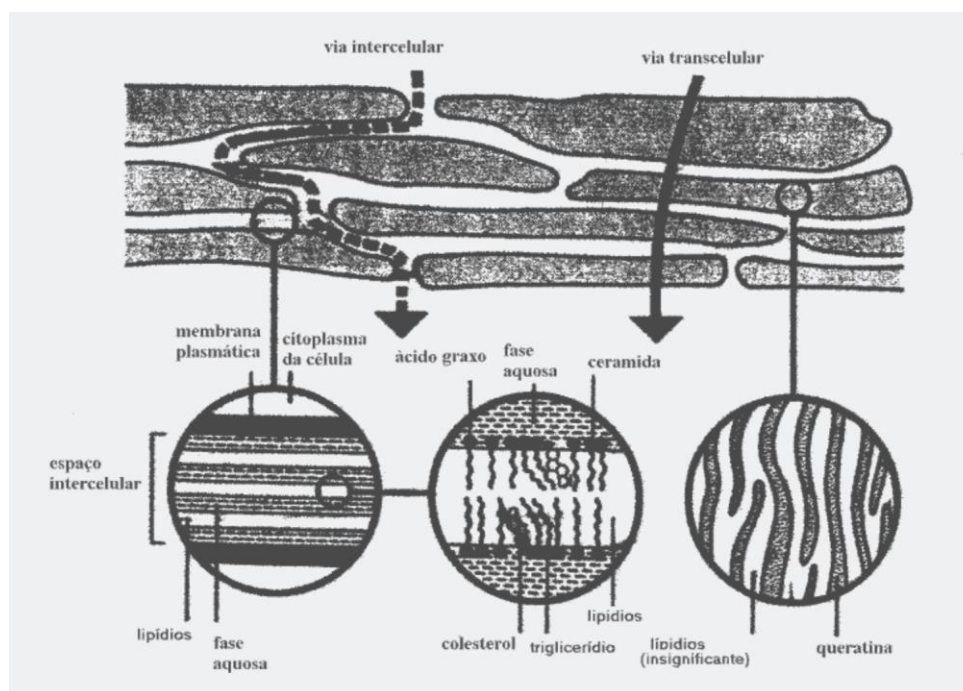
O estrato córneo destaca-se por ser a maior barreira para a permeação de substâncias quando a via de aplicação da formulação é a via tópica. Esta via de administração tem por objetivo alcançar maiores concentrações do fármaco no tecido alvo e uma baixa concentração sérica (HADGRAFT; LANE, 2005; FLORES; CASTRO; NASCIMENTO, 2012).

O desenvolvimento de sistemas terapêuticos transdérmicos tornou possível a passagem de quantidades terapêuticas de fármacos através da pele, com o objetivo de atingir a circulação sanguínea, para exercer efeitos sistêmicos (ALLEN; ANSEL; POPOVICH, 2011).

Os sistemas transdérmicos são sistemas adesivos que após serem aplicados sobre a pele, liberam o fármaco. Este atinge a corrente sanguínea numa velocidade constante, durante um período de tempo mais ou menos longo (PAPARELLA; VALLEY, 2005; ALLEN; ANSEL; POPOVICH, 2011). Além de serem desenvolvidos para uso humano, também podem ser aplicados no âmbito veterinário (GUEST, 2006).

Os possíveis mecanismos de permeação de um fármaco pela pele, de acordo com a Figura 1, são transcelular (entre os lipídios do estrato córneo), intercelular (através dos lipídios do estrato córneo) e através dos anexos cutâneos (GUESENS et al., 2011; ALLEN; ANSEL; POPOVICH, 2011).

FIGURA 1 - ESQUEMA QUE ILUSTRA AS ROTAS DE PERMEAÇÃO DO FÁRMACO ATRAVÉS DO ESTRATO CÓRNEO E DA MATRIZ LIPÍDICA



FONTE: adaptado de Suhonen et al. (1999).

Existem dois tipos básicos de sistemas de liberação transdérmica: os sistemas reservatórios e os sistemas matriciais (CSÓKA et al., 2006; ALLEN; ANSEL; POPOVICH, 2011).

Nos sistemas reservatórios a liberação do fármaco é controlada por uma membrana microporosa ou semipermeável. O reservatório pode ser composto pelo fármaco sólido ou uma suspensão em meio líquido. As paredes do reservatório são impermeáveis de um lado e não porosas ou microporosas de outro. O fármaco migra numa taxa controlada para o sítio de absorção. Tais sistemas liberam o fármaco numa taxa menor do que a capacidade de permeação da pele, sendo a liberação do fármaco, portanto, controlada pelo sistema e não pela pele (DITTGEN, 1998; ALLEN; ANSEL; POPOVICH, 2011).

Já nos sistemas matriciais o fármaco pode ser disperso em um gel que controla a difusão ou pode ser disperso em uma matriz polimérica contendo uma camada adesiva que controla a liberação do fármaco. Um lado da matriz permanece em contato com a pele, enquanto o outro lado é protegido por uma membrana laminada. O fármaco difunde através da estrutura até o sítio de absorção (VALENTA; AUNER, 2002).

As vantagens da via transdérmica de administração de fármacos são diminuir as variações plasmáticas de fármaco, diminuir a frequência de administração, anular a variabilidade da absorção oral, anular o metabolismo pré-sistêmico, possibilidade imediata de interromper a administração e constituir-se em boa alternativa à via intravenosa (ALLEN; ANSEL; POPOVICH, 2011).

3.2 POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS

De acordo com Villanova, Oréfice e Cunha (2010), os polímeros consistem em uma das classes mais versáteis de materiais com aplicações em diversas áreas. Podem ser utilizados como excipientes farmacêuticos na formulação de cosméticos e medicamentos e também como moduladores e direcionadores da liberação de fármacos em sítios específicos no organismo.

Polímeros biodegradáveis são polímeros nos quais a degradação ocorre pela ação de organismos vivos, tais como bactérias e fungos. Normalmente este processo resulta em gás carbônico (CO_2), gás metano (CH_4), outros gases em menores quantidades, além de componentes celulares microbianos (ROSA et al., 2002; CAMPAGNER et al., 2014). Estes polímeros podem ser oriundos de fontes naturais renováveis como milho, celulose, batata, cana-de-açúcar, ou serem sintetizados por bactérias a partir de pequenas moléculas como o ácido butírico ou o ácido valérico dando origem ao polihidroxibutirato (PHB) e ao polihidroxibutirato-co-valerato (PHB-HV), ou ainda serem derivados de fonte animal, como a quitosana ou proteínas (MOHANTY et al., 2005; RAY et al., 2005; BELGACEM et al., 2008). Os mais comumente usados são os polissacarídeos, os glicolípídeos, os proteoglicanos além de peptídeos (MOGOŞANU; GRUMEZESCU, 2014).

Alguns polímeros biodegradáveis podem ser obtidos de fontes fósseis, como o petróleo, ou da mistura entre biomassa e petróleo. Os oriundos do petróleo mais conhecidos são as policaprolactonas (PCL), as poliesteramidas, os copoliésteres alifáticos e copoliésteres aromáticos (BRITO et al., 2011).

Outro exemplo dessa classe de polímeros é a ϵ -polilisina (ϵ -PLL) um homopolímero de L-lisina, um aminoácido essencial. Diferente das outras proteínas, sua ligação peptídica não ocorre entre os grupos α -amino e carboxila, mas entre o grupo ϵ -amino e α -carboxila, formando uma amida (HIRAKI et al., 2003; CHANG et al., 2010; BO et al., 2014). Devido a sua atoxicidade, boa estabilidade térmica, solubilidade em água e elevada atividade antimicrobiana, suas aplicações incluem indústrias alimentícias, farmacêuticas e de pesticidas (CHANG et al., 2010; ZHANG et al., 2012; BO et al., 2014).

3.2.1 AMIDO

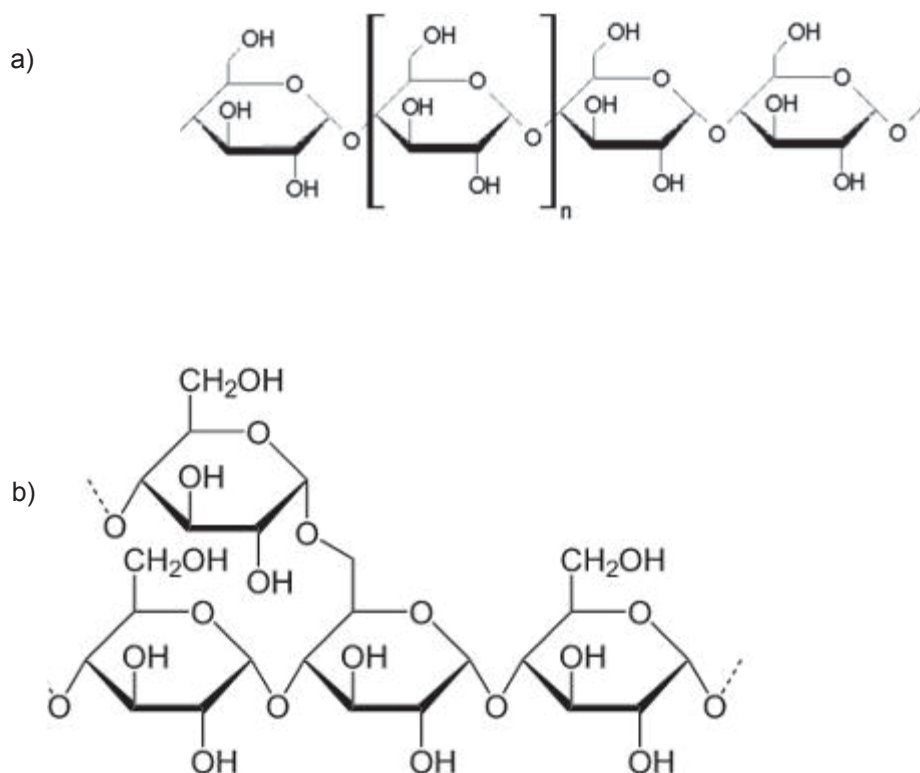
O amido é um polissacarídeo biodegradável, sendo um dos biopolímeros mais utilizados para produzir materiais biodegradáveis, compor formulações de medicamentos, alimentos e cosméticos pelo seu baixo custo, disponibilidade e atoxicidade (HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO, 2008; RANAA et al., 2011).

É formado pelos elementos químicos hidrogênio, oxigênio e carbono, apresentando a fórmula molecular $C_6H_{10}O_5$ e apresenta-se em grânulos com coloração branca e inodoro. Forma uma suspensão leitosa quando em contato com a água (LAJOLO; MENEZES, 2006). A forma, tamanho e a estrutura dos grânulos de amido dependem da fonte de origem botânica (BOBBIO; BOBBIO, 1995).

O amido pode ser obtido a partir de fontes como milho, batata, mandioca, aveia, ervilha, arroz, entre outras. Diferem em suas propriedades estruturais e químicas devido a diferentes proporções de amilose e amilopectina (BOBBIO; BOBBIO, 1995; THIRÉ et al., 2004).

O amido é constituído por dois tipos diferentes de polímeros de glicose, a amilose e a amilopectina, com estruturas e funcionalidades diferentes conforme ilustra a Figura 2.

FIGURA 2 – ESTRUTURA DO AMIDO.



FONTE: adaptado de Isotton (2013).

NOTA: Figura a – estrutura química da amilose. Figura b- estrutura química da amilopectina.

A amilose é um polímero linear formado por unidades de 1,4-D-glicopirranose, (FIGURA 2a) seu grau de polimerização médio é de 324 a 4920 Dalton (COULTATE, 2002; TESTER et al., 2004).

As moléculas de amilose podem enrolar-se de forma rígida formando uma única hélice ou ainda podem formar zonas de junção de duplas hélices paralelas ainda mais rígidas. O interior da hélice contém átomos de hidrogênio proporcionando um caráter hidrofóbico. Este permite que a amilose forme complexos com ácidos graxos livres, com componentes glicéridos dos ácidos graxos, com alguns álcoois e com iodo (GUENET, 1992; DONALD, 2004).

A amilopectina é um polímero altamente ramificado com ligações α -1,4 e ramificações através da ligação α -1,6 (FIGURA 2b) (COULTATE, 2002).

Em água fria os grânulos de amido são insolúveis, devido às fortes ligações de hidrogênio que formam entre suas cadeias. No entanto, através do aquecimento, a água incorpora-se na estrutura do grânulo de amido e a amilose, a qual é o componente mais solúvel, dissocia-se e difunde-se para

fora do grânulo, resultando no aumento da viscosidade. Esse processo é denominado gelatinização sendo a base da conversão de amido em um material termoplástico (LIU et al., 2009). Após a gelatinização do amido, quando a temperatura é reduzida, as moléculas tendem a reassociar-se em uma estrutura ordenada cristalina durante o armazenamento, o que é denominado de retrogradação (FRANCO, 2001). No processo de retrogradação, ocorre liberação de moléculas de água anteriormente ligadas às cadeias de amilose, esse fenômeno é conhecido como sinérese (BOBBIO; BOBBIO, 1995).

Devido à excelente biodegradabilidade, baixo custo de produção e obtenção a partir de recursos renováveis, o amido constitui-se como uma substância em potencial para aplicações biomédicas, principalmente na pesquisa voltada à obtenção de biomateriais usualmente empregados em implantes, bem como constituinte na formulação de novos materiais para essas aplicações (VASQUES, 2007).

De acordo com Silva et al. (2004), os materiais a base de amido podem ser degradados no corpo humano através da ação de enzimas, resultando em produtos de degradação que podem ser rapidamente metabolizados e excretados. Ao mesmo tempo em que são degradados esses biomateriais podem servir como suporte para crescimento de células. Um exemplo são os hidrogéis a base de amido, que podem ser uma alternativa interessante para aplicações biomédicas em sistemas de liberação controlada de fármacos (ELVIRA et al., 2002).

O amido também pode ser uma alternativa para o aprimoramento de superfícies de compósitos melhorando assim seu desempenho de proliferação e adesão celular (LEONOR et al., 2003). Outras pesquisas relacionadas a compósitos a base de amido comprovaram seu potencial como alternativa para várias aplicações biomédicas (GOMES et al., 2002; SALGADO et al., 2002; SILVA et al., 2004).

3.2.1.1 Filmes a base de amido

Devido a lenta biodegradação dos materiais poliméricos, os biopolímeros formados por amido estão revolucionando o mercado de descartáveis (ABATTI; DOMINGUES JUNIOR, 2011; CAMPAGNER et al., 2014).

Os amidos podem ser utilizados como matrizes poliméricas termoplásticas. Isto é possível devido à capacidade do amido em formar um material parecido com o plástico na presença de temperatura, como também pressão e cisalhamento. Além disso, seu baixo custo e o fato de ser abundante e renovável são vantagens que levam ao interesse de sua incorporação em misturas poliméricas (KASEEM; HAMAD; DERI, 2012; CAMPAGNER et al., 2014).

Os filmes à base de amido, assim como alguns outros filmes poliméricos, podem ser produzidos pela técnica de moldagem do tipo *casting*. Esta técnica ocorre em duas etapas: a primeira consiste em gelatinizar o amido para desestruturar os grânulos. A segunda etapa é a deposição dessa solução filmogênica em um molde para posterior secagem em estufa visando a obtenção do filme polimérico termoplástico (CIOBANU et al., 2004; CAMPAGNER et al., 2014).

Os plastificantes são substâncias utilizadas com o intuito de aumentar a flexibilidade de um polímero. O plastificante atua na redução das forças intermoleculares e no aumento da mobilidade das cadeias dos polímeros, com diminuição de possíveis descontinuidades e zonas quebradiças, resultando assim em materiais com menores temperaturas de transição vítrea (T_g). A redução da T_g influencia nas propriedades mecânicas dos filmes, podendo ocorrer um declínio da força na perfuração e o aumento da deformação (VAN SOEST; VLIEGENTHART, 1997; RABELO 2000).

Na ausência de plastificantes, os filmes de amido são altamente quebradiços (ZHANG; HAN, 2006). Polióis como o glicerol e o sorbitol são comumente utilizados em filmes de amido e proporcionam uma melhoria significativa nas suas propriedades mecânicas (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

A quantidade do plastificante a ser incorporado nos filmes de amido, é um fator importante. Dependendo da concentração em que são empregados podem causar um efeito chamado antiplastificante, ou seja, ao invés de aumentar a flexibilidade e hidrofiliidade, podem causar um efeito contrário, denominado de efeito antiplastificante (CUQ et al., 1995; GAUDIN et al., 2000; MALI et al., 2005; MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010). Este efeito ocorre quando são acrescentadas concentrações insuficientes de plastificante. Logo, este interage com a matriz polimérica, aumentando o grau de interações e a rigidez da matriz, pois não possui quantidade suficiente para aumentar a mobilidade das moléculas (MALI et al., 2005; CHANG; KARIM; SEOW, 2006).

3.2.1.2 Propriedades dos filmes de amido

Vários estudos têm sido feitos para analisar as propriedades de filmes à base de amido (ARVANITOYANNIS et al., 1998; GARCIA; MARTINO; ZARITZKY, 2000; MALI et al., 2002; 2004; 2005; MALI; GROSSMANN, 2003; VASQUES, 2007; MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010; ISOTTON, 2013; COSTA et al., 2017). Conforme descrito por Mali; Grossmann; Yamashita (2010), as propriedades físicas dos filmes de amido são influenciadas por alterações de temperatura e umidade relativa durante a realização dos ensaios de caracterização.

3.2.1.2.1 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes poliméricos são de grande relevância devido às condições que os polímeros devem atender para a sua aplicação (ISOTTON, 2013).

A formulação e o processo de produção exercem influência sobre as propriedades mecânicas. Na formulação destaca-se o teor de plastificante, como já citado anteriormente.

Os ensaios de tração são realizados aplicando-se uma força ao material em determinadas condições, como deformação a velocidade constante, até o momento da ruptura do material. Nos ensaios a tensão suportada pelo filme e a deformação imposta são registrados (ISOTTON, 2013).

De acordo com a norma ASTM D882-10, a tensão é a razão entre a carga ou força de tração e a área da seção transversal do corpo de prova, conforme a Equação 1:

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (\text{EQUAÇÃO 1})$$

Onde: σ a tensão (Mpa), F é a força de tração (N) e A é a área da seção transversal inicial do filme (mm^2).

A deformação dos filmes é determinada pela Equação 2:

$$\varepsilon = \frac{L - L_0}{L_0} \cdot 100 \quad (\text{EQUAÇÃO 2})$$

Onde: ε : porcentagem de deformação do filme (%), L o comprimento de alongação do filme durante o teste e L_0 é o comprimento inicial do filme em (mm^2).

3.2.1.2.2 Propriedades de barreira

Segundo Al-Hassan; Norziah (2012), filmes poliméricos podem servir como barreiras de transferência de massa, umidade, oxigênio, dióxido de carbono.

A permeabilidade ao vapor de água é a medida da facilidade com que um material pode ser penetrado pelo vapor de água. A Norma ASTM E96-95 (1995) define permeabilidade como a taxa de transmissão de vapor de água através da unidade de área do material plano, a uma determinada espessura, induzida pela diferença de pressão de vapor entre duas superfícies específicas, sob condições de temperatura definidas.

Conforme descrito por Larotonda et al. (2005) e Muller et al. (2008), as propriedades de barreira dos polímeros dependem de algumas características como morfologia, área e espessura do filme, densidade, coeficiente de solubilidade do polímero com a água e temperatura. Durante a permeabilidade

de gases ou vapor de água em sólidos, as moléculas da substância permeante podem ou não interagir com o sólido.

A permeabilidade ao vapor de água é influenciada pela umidade relativa do ar, propriedades higroscópicas, bem como, da hidrofília do material. Filmes altamente hidrofílicos diminuem a barreira ao vapor de água e afetam a permeabilidade a gases (LARATONDA et al., 2005; MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

3.2.1.2.3 Espessura

Conforme descrito por Carvalho (1997), Sobral (2000a, 2000b), Mali et al., (2004a) e Galdeano (2007), esta característica influencia nas propriedades mecânicas, principalmente a força na perfuração e a permeabilidade ao vapor de água de filmes hidrofílicos. O controle da espessura dos filmes produzidos por *casting* é uma etapa que exige atenção e é, ainda, um parâmetro pouco estudado (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

3.3 O USO DE FILMES POLIMÉRICOS COM ATIVOS VEGETAIS

Diversos agentes ativos, incluindo compostos orgânicos, minerais e vegetais podem ser incorporados nos filmes (MI et al., 2002; MI et al., 2003). Compostos polifenólicos e flavonoides, por exemplo, podem contribuir para que os filmes apresentem efeito antioxidante, antimicrobiano e anti-inflamatório mais pronunciado (MI et al., 2002). Desse modo, a incorporação de ativos vegetais em matrizes tem sido estudada em diversos trabalhos visando explorar os possíveis efeitos bioativos como também a liberação controlada (VODNAR, 2012; WANG et al., 2013).

Siripatrawan e Harte (2010) testaram o extrato de chá verde incorporado em membrana de quitosana para avaliação de sua atividade antioxidante devido à presença de compostos fenólicos. Oliveira (2017) desenvolveu filmes à base de gelatina adicionados de extratos vegetais, com propriedades físicas e funcionais para seu emprego como embalagens bioativas. Foram produzidos extratos aquosos de sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth), folha de amoreira preta (*Morus nigra* L.), carqueja (*Baccharis crispa* Spreng.), hortelã (*Mentha piperita* L.) e folha de pitangueira

(*Eugenia uniflora* L.), os filmes com extratos demonstraram um aumento na atividade antioxidante e propriedades de barreira. Os crescidos com extrato de folha de pitangueira, os que apresentaram melhores resultados.

Neste contexto, pode-se observar que trabalhos relatados na literatura científica exploram o potencial antioxidante, anti-inflamatório e cicatrizante de extratos vegetais e avaliam o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas contendo estes extratos (NAYAK et al., 2012; BORGES et al., 2013; MÜLLER, 2013).

3.3 GÊNERO *Baccharis* L.

O nome *Baccharis* vem do grego *Bakkharis*, antiga denominação para plantas arbustivas (KISSMAN, GROTH, 1999). Este gênero pertence à tribo Astereae e à subtribo Baccharinidae. A subtribo Baccharinidae é exclusivamente americana, sendo formada pelos gêneros *Archibaccharis* e *Baccharis* (MÜLLER, 2006). Segundo Boldt (1989) aproximadamente 90% das espécies de *Baccharis* são encontradas na América do Sul, onde se observa uma grande variedade morfológica. O gênero apresenta-se principalmente como arbustos perenes podendo atingir de 0,5 a 4,0 metros de altura.

No Brasil são encontradas 179 espécies, com a maior concentração nas regiões Sul e Sudeste do país. Aproximadamente 87 espécies habitam o estado do Paraná (HEIDEN, BAUMGRATZ; ESTEVES, 2012; HEIDEN, LEONI; NAKAJIMA, 2014; HEIDEN; SCHNEIDER, 2014).

As espécies de *Baccharis* que possuem cladódios são chamadas popularmente de “carquejas” ou “carquejinhas”. Os cladódios assumem o papel de folha, ao passo que estas estão praticamente ausentes ou reduzidas, com função fisiológica restrita para a planta (BARROSO, 1976). Geralmente essas espécies pertencem a Seção Aphyllae como por exemplo: *B. glaziovii* Baker, *B. penningtonii* Heering, *B. articulata* (Lam.) Pers. entre outras (HEIDEN; IGANCI, MACIAS, 2009). Entretanto, as espécies de *Baccharis* que apresentam ramos não alados são conhecidas popularmente como “vassouras” ou “vassourinhas” a exemplo de *B. dracunculifolia* DC., *B. microdonta* DC., *B. spicata* (Lam.) Baill., *B. caprariifolia* DC. entre outras (BARROSO; BUENO, 2002; BOBEK et al., 2015; BOBEK et al., 2016).

É um gênero que possui importância econômica, pois, apresenta espécies que ajudam no combate à erosão formando os chamados “vassourais” e outras que são utilizadas como plantas ornamentais a exemplo de *B. hamilifolia* L. No entanto, este gênero pode apresentar espécies que são consideradas como pragas de difícil controle em pastagens, podendo causar intoxicações para o gado a exemplo de *B. coridifolia* DC. (mio-mio), *B. artemisioides* Spreng., *B. megapotamica* Spreng. (CARNEIRO; FERNANDES, 1996; FLORA DO BRASIL EM CONSTRUÇÃO 2020).

Considerando o uso popular, as propriedades medicinais atribuídas às espécies *Baccharis* vêm sendo investigadas pela comunidade científica, na tentativa de caracterizar seus princípios farmacologicamente ativos (BUDEL et al., 2018). As espécies são consumidas, normalmente, na forma de chás para males do trato digestório, anemias, controle da hipertensão, inflamações, diabetes e doenças da próstata, inflamações do sistema urinário, amigdalite, vermicida, entre outros (CORRÊA, 1984; HEIDEN et al., 2006; HEIDEN; IGANCI; MACIAS, 2009; SIMÕES-PIRES et al., 2005; VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

Espécies de *Baccharis* têm sido pesquisadas por apresentar vários metabólitos secundários que podem ser utilizados na indústria química e farmacêutica. Estes compostos são representados por flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, saponinas e óleos essenciais (BORELLA; FONTOURA, 2002; FUKUDA et al., 2006; FABIANE et al., 2008, CAMPOS et al., 2016).

Em relação às atividades biológicas, os efeitos alelopáticos, antimicrobianos, citotóxicos, antioxidantes e anti-inflamatório têm se destacado. As espécies, *B. coridifolia* DC., *B. dracunculifolia* DC., *B. grisebachii* Hieron, *B. incarum* (Wedd.) Perkins, *B. megapotamica* Spreng, *B. salicifolia* (Ruiz & Pav) Pers., *B. trinervis* (Lam.) Pers., e *B. uncinella* DC., são as mais estudadas em relação à composição química e à atividade biológica (CORRÊA, 1984; KORBES, 1995; VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). Entretanto a espécie mais estudada sob aspectos morfológico, anatômico, farmacológico, químico e de controle da qualidade é *Baccharis crispa* (sym *B. trimera* (Less.) DC. (BUDEL, 2009).

A fitoquímica de *Baccharis* tem sido estudada desde o início do século XXI e, mais de 150 compostos já foram isolados e identificados, sendo 120

espécies analisadas quimicamente (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005; ABAD; BERMEJO, 2007; KARAM et al., 2013).

Baccharis é rico em óleo essencial, sendo considerado uma importante fonte para a indústria de perfumaria (QUEIROGA; FERRACINI; MARSAIOLI, 1996). No entanto, o número de espécies cujos óleos essenciais foram estudados é pequeno, levando em consideração que este gênero apresenta cerca de 354 espécies (NESOM; ROBINSON, 2006; GIULIANO; FREIRE, 2011; MÜLLER, 2013; CAMPOS et al., 2016).

O óleo essencial de *Baccharis* apresenta composição química variada, sendo que foram caracterizados, carquejol, acetato de carquejila, germacreno-D, α e β -pineno, trans- β -ocimeno, nerolidol, óxido de cariofileno e espatulenol (FABIANE et al., 2008; BUDEL et al., 2012). Os sesquiterpenos parecem ser os compostos majoritários na maioria das espécies estudadas (BUDEL et al., 2018)

Apresentam diversas atividades biológicas, a exemplo anti-leishmanicida, citotóxica, antiviral, anti-asmática entre outras. Alguns exemplos estão apresentados no QUADRO 1.

QUADRO 1: ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES DE *Baccharis*.

(continua)

Espécie de <i>Baccharis</i>	Atividade	Referência
<i>B. ochracea</i> Spreng.	Citotóxica	Monks et al., 2002
<i>B. illinita</i> DC.	Gastroprotetora	Baggio et al., 2003
<i>B. grisebachii</i>	Antiúlcera	Tapia et al., 2004
<i>B. genistelloides</i> (Lam.) Pers.	Gastroprotetora	Coelho et al., 2004
<i>B. dracunculifolia</i>	Antigenotoxicidade	Oliveira et al., 2011
<i>B. uncinella</i>	Anti-leishmanicida	Passero et al., 2011
<i>B. articulata</i>	Hipoglicêmica	Kappel et al., 2012
<i>B. darwinii</i> Hook. & Arn.	Inseticida	Kurdela et al., 2012
<i>B. retusa</i>	Anti-leishmanicida e anti-tripanosomicida	Greco et al., 2012
<i>B. articulata</i>	Anti-inflamatória	Florão et al., 2012
<i>B. crispa</i>	Emagrecedora	Souza et al., 2012
<i>B. salicifolia</i>	Inseticida e nematocida	Sosa et al., 2012
<i>B. articulata</i>	Antimutagênica	Rodriguez, 2013
<i>B. crispa</i>	Anti-schistosomicida	Oliveira et al., 2012

<i>B. retusa</i> DC.	Antiasmática	Toledo et al., 2013
<i>B. gaudichaudiana</i> DC.	Antiviral	Jaime et al., 2013
<i>B. crispa</i>	Anti-helmintica	Oliveira et al., 2014a
<i>B. dracunculifolia</i>	Atividade antitumoral dos compostos Artepilina C e Baccharina	Oliveira et al., 2014b
<i>B. crispa</i>	Proteção contra injúria hepática	Pádua et al., 2014
<i>B. crispa</i>	Bloqueador do canal de cálcio	Garcia et al., 2014
<i>B. crispa</i>	Genotoxicidade	Menezes et al., 2015
<i>B. dracunculifolia</i>	Acaricida	De Assis et al., 2015
<i>B. oreophila</i> Malme	Antimicrobiana e Antioxidante	Oliveira, 2016
<i>B. trinervis</i> (Lam.) Pers.	Hemolítica	Sobrinho et al., 2016
<i>B. anomala</i> DC.	Antiviral	Venturi et al., 2018
<i>B. aracatubaensis</i>	Antioxidante	Zuccoloto et al., 2019

Fonte: a autora (2018).

3.4.1 Metabólitos secundários de interesse no gênero *Baccharis*

Os principais constituintes do gênero *Baccharis* descrito na literatura nos últimos onze anos são compostos fenólicos e terpenoides. Durante este período, 27 espécies forneceram 139 compostos. Em geral, flavonoides e diterpenoides foram as principais classes encontradas no gênero (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005; CAMPOS et al., 2016). Quercetina, kaempferol, apigenina, naringenina; ácidos fenólicos, artepilina C, drupanina, ácido ferúlico, ácido cafeoilquímico; e terpenoides, ácido oleanólico e α -spinasterol são comumente encontrados (CAMPOS et al., 2016).

3.4.1.1 Flavonoides

Os flavonoides constituem uma classe de compostos polifenólicos de ampla distribuição no reino vegetal. São encontrados nas plantas majoritariamente na forma de glicosídeos e como pigmentos amarelos, laranjas, azuis e roxos das flores (MUSCHIETTI; MARTINO, 2016). Os flavonoides exercem diversas funções no vegetal, a saber: proteção contra a incidência de raios ultravioleta e visível, proteção contra insetos e

microrganismos, atração de agentes polinizadores, antioxidante, controle da ação de hormônios vegetais, agentes alelopáticos e inibidores de enzimas (MUSCHIETTI; MARTINO, 2016; ZUANAZZI; MONTANHA; ZUCULOTTO, 2017). Apresentam um núcleo característico C6-C3-C6, sendo biossintetizados a partir das vias do ácido chiquímico e do acetato (CAZZAROLLI et al., 2008).

Vários flavonoides tem sido freqüentemente isolados do gênero *Baccharis*. Destes, 57 foram descritos nos últimos anos, com oito flavonas sendo inéditos: luteolina (*B. illinita*) (TAPIA et al., 2004; VERDI; BRIGHENTE; PIZOLATTI, 2004), tangeritina (*B. illinita*) (TAPIA et al., 2004), retusina e 3,4',7-trimetilquercetina (*B. illinita*) (PIZZOLATTI et al., 2006; CALLE et al., 2012) Aromadendrin-7-methyl ether (*B. dracunculifolia*) (PIZZOLATTI et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2014; LEMOS et al., 2007; REZENDE et al., 2007), Dihydrooroxylin A (*B. uncinella*) (GRECCO et al., 2012), Filifolin (*B. boliviensis* (Weed.)Cabrera) (CALLE et al., 2012).

Diversas atividades biológicas são atribuídas a essa classe de polifenóis, tais como atividade antitumoral, antioxidante, antiviral e anti-inflamatória, dentre outras, o que lhe confere significativa importância farmacológica (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; VEITCH; GRAYER, 2008; CAZZAROLLI et al., 2008). Dentre os 40 fármacos anti-inflamatórios aprovados entre 1983 e 1994, 12 foram derivados ou baseados em polifenóis de origem natural (YOON; BAEK, 2005).

3.4.1.1.1 Atividade anti-inflamatória dos flavonoides

A inflamação é um processo complexo gerado por diferentes agentes inflamatórios, podendo ser biológicos, químicos, físicos, traumatismos, alterações vasculares e imunológicas (MUSCHIETTI; MARTINO, 2016).

A área inflamada, em nível macroscópico, exibe características marcantes. A região atingida torna-se avermelhada, edemaciada, quente e dolorosa, havendo interferência ou alteração da sua função (LUENGO, 2005).

São numerosos os estudos que demonstram que os flavonoides podem prevenir e atenuar a resposta inflamatória, atuando através de uma grande variedade de mecanismos, o que os tornam em potenciais agentes

cardioprotetores, neuroprotetores e quimiopreventivos (MUSCHIETTI; MARTINO, 2016).

O interesse que os compostos naturais têm despertado como agentes anti-inflamatórios consistem nas vantagens apresentadas sobre os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) clássicos. Assim sendo, sugere-se que os flavonoides apresentam uma alta margem de segurança sem os efeitos ulcerogênicos de outras drogas anti-inflamatórias (DI CARLO et al., 1999). De fato, alguns flavonoides como canferol, rutina e a leucocianidina apresentam o efeito de proteção da mucosa gástrica contra diversos agentes ulcerogênicos (LA CASA et al., 2000).

Algumas espécies de *Baccharis* demonstraram efeitos gastroprotetores, tais como *B. dracunculifolia*, *B. illinita* e *B. crispa*. Extratos e diferentes substâncias isoladas demonstraram a inibição da secreção de ácido gástrico por atuarem na manutenção de fatores de proteção, como muco, bicarbonato e fluxo sanguíneo. Os efeitos atribuídos a estas plantas estão relacionados com a alta concentração de flavonoides e ácidos fenólicos (BAGGIO et al., 2003; LEMOS et al., 2007; DIAS et al., 2009).

São propostos diversos mecanismos moleculares em relação à atividade anti-inflamatória dos flavonoides. Agem modulando células envolvidas com a inflamação (por exemplo, inibindo a proliferação de linfócitos T), inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- α e IL1), modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como fosfolipase A2, ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase, além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; HAVSTEEN, 2002; KIM et al., 2004; CAZAROLLI et al., 2008; LOPEZ-POSADAS et al., 2008).

O extrato aquoso de *B. crispa*, reduziu significativamente a inflamação em um modelo inflamatório experimental de carragenina induzida em ratos (PAUL et al., 2009). Outros estudos foram realizados para comprovar atividades *in vitro* ou *in vivo* demonstrando efeitos anti-inflamatórios para os extratos de *B. nitida* (Ruiz & Pav.)Pers., *B. latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers., *B. pentlandii* DC., *B. juncea* (Xehm) Desf., *B. illinita*, e *B. uncinella* DC. (ABAD et al., 2007; BOLLER et al., 2010; ZALEWSKI et al, 2011).

3.4.1.1.2 Atividade antioxidante dos flavonoides

Antioxidantes são substâncias que presentes mesmo em pequenas concentrações retardam as reações de degradação oxidativa, isto é, diminuem a velocidade da oxidação por um ou mais mecanismos. Podem apresentar diferentes formas de proteção e agir em diversas etapas do processo oxidativo, podendo ser classificados em duas categorias principais: antioxidantes primários e secundários (HALLIWEL et al., 1995).

A atividade antioxidante dos flavonoides resulta em uma combinação de suas excelentes propriedades quelantes de ferro e sequestradoras de radicais livres, assim como inibidores de enzimas responsáveis pela produção de O_2 como lipoxigenase, ciclooxygenase, mieloperoxidase, NADPH oxidase e xantina oxidase (VAN ACKER et al., 1996; KORKINA; AFANAS'EV, 1997). Outros mecanismos incluem a inibição de enzimas envolvidas indiretamente nos processos oxidativos, como no caso da fosfolipase e a estimulação de outras enzimas com reconhecidas propriedades antioxidantes como a catalase e a superóxido dismutase. Desta forma os flavonoides podem interferir não somente nas reações de propagação, mas, também na formação do radical em si (MUSCHIETTI; MARTINO, 2016).

Segundo Alves et al. (2010), os diferentes tipos de radicais livres e as diferentes formas de atuação nos organismos vivos requerem variados métodos para avaliar a atividade de antioxidantes obtidos de produtos naturais. Os mais utilizados são avaliação do sequestro de radicais DPPH • (2,2-difenil-1-picrilhidrazila); capacidade de redução do cátion ABTS • (ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolino-6- sulfônico); determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), redução do íon férrico (FRAP) e redução do complexo fosfomolibdênico (THAIPONG et al., 2006).

A atividade antioxidante de *Baccharis* tem sido avaliada por vários autores com ensaios *in vitro* como DPPH (AKAIKE et al., 2003; TAPIA et al., 2004; FABRI et al., 2011; MARTINEZ-CORREA et al., 2012; SARTOR et al., 2013; ARGOTI et al., 2013; ZIELINSKI et al., 2014), a reação da enzima xantina oxidase (TAPIA et al., 2004; BORGO et al., 2010), ensaio de quimioluminescência (PÁDUA et al. 2010), TBARS (OLIVEIRA et al., 2004), e FRAP (ZIELINSKI et al., 2014) demonstrando excelentes resultados.

3.4.2 *Baccharis erioclada* DC.

A posição sistemática de *Baccharis erioclada* DC. (FIGURA 3) está descrita na TABELA 1.

TABELA 1- POSIÇÃO SISTEMÁTICA DAS ESPÉCIES DE *Baccharis*.

	Sistema de CRONQUIST (1988)
Divisão	II – Magnoliophyta
Classe	1ª – Magnoliopsida
Subclasse	VI – Asteridae
Ordem	11 – Asterales
Família	1 – Asteraceae
Gênero	<i>Baccharis</i> L.
Espécie	<i>Baccharis erioclada</i> DC.

Fonte: CRONQUIST (1988).

FIGURA 3 – RAMOS VEGETATIVOS E REPRODUTIVOS DE *B. erioclada* DC.



FONTE: a autora (2014).

Apresenta como sinonímia *Baccharis psilocalyx* Mart. ex Baker (THE PLANT LIST, 2019). É conhecida popularmente como “vassoura-lageana” e apresenta-se como um arbusto com ramos tomentosos, folhas ovadas a elípticas, de margem denticulada ou inteira, que medem aproximadamente 1-2 cm de comprimento e 0,5 mm de largura (BARROSO, 1976).

Pode ser encontrada nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Esta planta floresce nos meses de julho a abril, frutificando logo em seguida. O nome “erioclada” de origem grega significa ramos lanosos

e está relacionado com o indumento denso que reveste toda planta (BARROSO; BUENO, 2002).

A morfoanatomia dessa espécie foi estudada por Bobek et al. (2015) onde foram observadas as seguintes características: em vista frontal, as células epidérmicas apresentam parede anticlinal com formato ligeiramente ondulado na face adaxial e ondulado na face abaxial. Em secção transversal, a epiderme apresentou-se uniestratificada com células isodiamétricas. *B. erioclada* apresentou-se hipoestomática com estômatos anomocíticos e anisocíticos presentes apenas na face abaxial. Também foram observados tricomas flageliformes ramificados com 2 células de base. Essas características são importantes para a identificação de espécies de *Baccharis*, uma vez que são morfológicamente similares, dificultando a identificação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

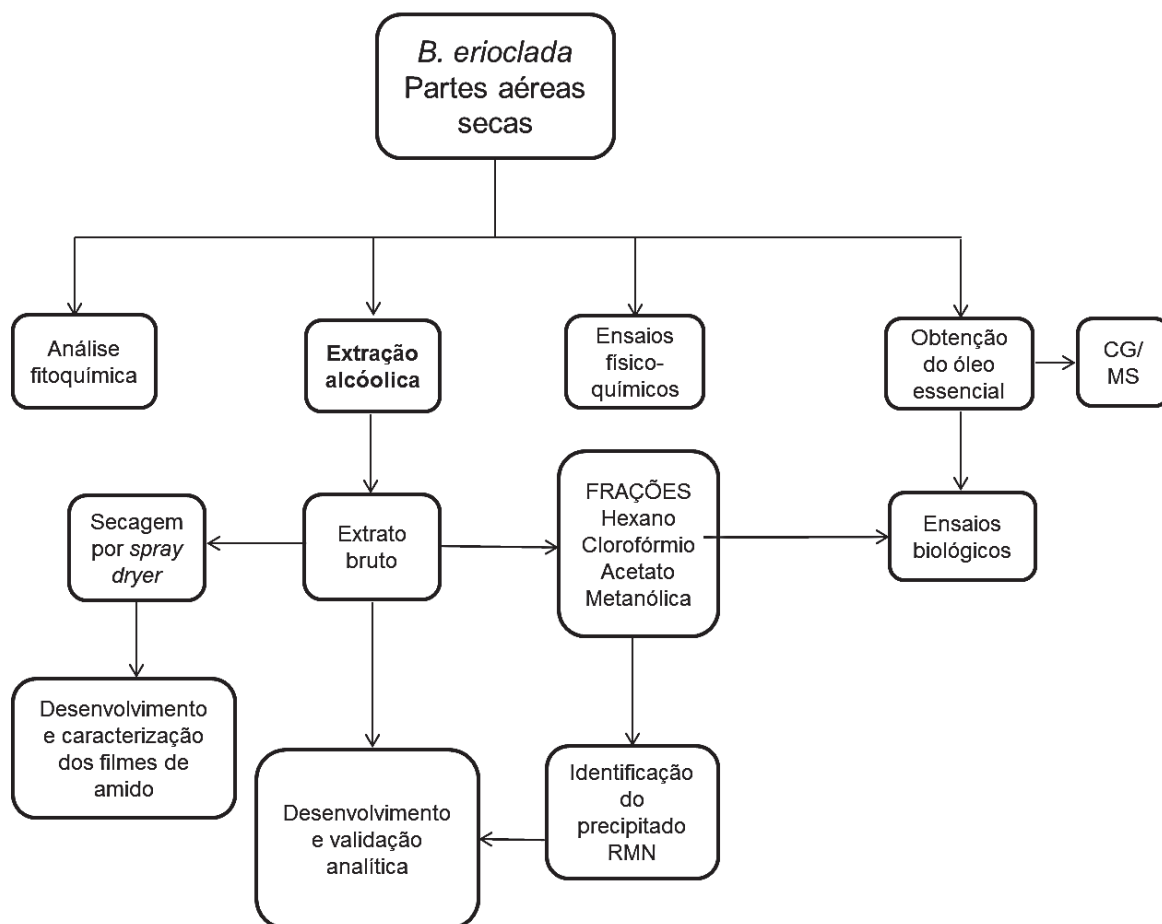
A coleta de partes aéreas floridas de *B. erioclada* DC., foi realizada na em julho de 2014, região dos Campos Gerais, Ponta Grossa-PR (coordenadas 25° 08' S e 50° 27' W).

As exsicatas foram identificadas pelo Dr. Gustavo Heiden e depositadas no Museu Botânico Municipal de Curitiba-PR sob número 119462.

A utilização da espécie vegetal *Baccharis erioclada*, possui autorização das atividades de acesso ao patrimônio genético expedido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) através do projeto “Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais” constante no processo de nº 02001.001165/2013-47 (ANEXO 1).

Um fluxograma dos procedimentos práticos como ensaio sistemático de análise fitoquímica, ensaios físico-químicos, atividades biológicas e desenvolvimento dos filmes estão resumidos na FIGURA 4.

FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DE DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DE MATERIAL E MÉTODOS



FONTE: a autora (2018).

4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MATERIAL VEGETAL

4.2.1 Determinação de umidade

O conteúdo de água presente na espécie vegetal foi determinado por analisador de umidade (SHIMADZU, modelo MOC63u, Quioto, Japão), previamente calibrado. Aproximadamente 0,1 g de amostra foi colocada em um prato de alumínio e mantida em aquecimento a 105 °C, até peso constante, resultando no teor de umidade expresso em porcentagem. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.2 Determinação de cinzas totais

Foi pesado cerca de 3 g da amostra pulverizada, a qual foi transferida para cadinho (de platina) previamente tarado. A amostra foi distribuída uniformemente no cadinho e incinerada até 600 ± 25 °C. O material foi resfriado em dessecador e pesado (FARMACOPEIA, 2010). As análises foram realizadas em triplicata e a porcentagem de cinzas em relação ao peso do material vegetal seco, foi calculada através da fórmula:

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{P_2 - P_1}{P_a} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

P_1 = Peso do cadinho vazio

P_2 = Peso do cadinho com a amostra

P_a = Peso da amostra

4.2.3 Estudo termoanalítico

O estudo termoanalítico das partes aéreas pulverizadas de *B. erioclada* foi realizado por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TGA). As curvas de TGA foram obtidas na faixa de temperatura de 30 a 700°C, utilizando termobalança modelo TGA 50 da marca Shimadzu, sob atmosfera dinâmica, sob vazão de ar sintético ($150 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), razão de aquecimento de $15 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, utilizando cadinho de alumínio contendo massa de amostra em torno de 5 mg das partes aéreas secas da droga vegetal.

As curvas DSC foram obtidas a partir de 10 mg de amostra. A amostra foi aquecida a uma razão constante de $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, sendo obtidas na faixa de temperatura entre 20 e 600 °C, sob fluxo de nitrogênio ($50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), em célula calorimétrica de alumina aberta. O instrumento STA 6000 (PERKIN ELMER, Whaltam, MA, Estados Unidos) foi calibrado usando Índio (In; PF: $156,6 \text{ }^\circ\text{C}$; ΔH fusão: $28,54 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$) como padrão.

A calibração do instrumento foi verificada antes dos ensaios e empregando-se um padrão de oxalato de cálcio monoidratado (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, 1993).

4.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA

4.3.1 Pesquisa de alcaloides

Para a preparação do extrato, foram colocados em um béquer contendo 2 g da droga vegetal, seca e fragmentada, 40 mL de ácido sulfúrico a 1% e levou-se à fervura por 5 min. Posteriormente, filtrou-se em algodão e resfriou-se. Em seguida, alcalinizou-se o extrato até pH 10 com hidróxido de amônia a 40%, usando papel indicador de pH. O extrato alcalinizado foi transferido para um funil de separação e extraíram-se os alcaloides com 20 mL de éter etílico, agitando cautelosamente. Foi coletada a camada etérea e filtrado em sulfato de sódio anidro. Transferiu-se o extrato etéreo para uma cápsula de porcelana e aqueceu-se em banho-maria para concentração até a secura. Posteriormente, o resíduo formado foi dissolvido em 2 mL de ácido sulfúrico a 1% e distribuído para 3 tubos de ensaio pequenos e gotejou-se os reativos gerais: Dragendorff, Meyer e Bouchardart (COSTA, 2001).

4.3.2 Pesquisa de Antraderivados

4.3.2.1 Pesquisa de antraderivados livres

Em um *erlenmeyer* com tampa, 4 g do material vegetal em estudo seco e fragmentado com 30 mL de éter etílico. Agitou-se e deixou-se em repouso por 15 minutos. Filtrou-se, transferiu-se para um tubo de ensaio e adicionou-se 2 mL de hidróxido de amônio a 4%. Os antraderivados livres são aglicônicos e reagem com bases formando íons fenolatos, resultando em complexos coloridos (COSTA, 2001).

4.3.2.2 Pesquisa de O-heterósidos antraquinônicos

Ferveu-se aproximadamente 4 g do material vegetal em estudo seco e fragmentado com 50 mL de álcool etílico a 25% por 5 min. Em seguida, filtrou-se e acidificou-se com 30 mL de ácido sulfúrico a 10% e ferveu-se novamente por mais 5 minutos. Resfriou-se e transferiu-se o extrato para um funil de separação com 20 mL de clorofórmio. Agitou-se vagarosamente para a

decantação da camada clorofórmica. Filtrou-se com sulfato de sódio anidro e transferiu-se para um tubo de ensaio. Adicionou-se 2 mL de hidróxido de amônio a 40% (COSTA, 2001).

4.3.2.3 Pesquisa de C-heterósidos antraquinônicos

Aproximadamente 4 g do material vegetal em estudo seco e fragmentado foi fervido em 10 mL de H₂O destilada e 20 mL de cloreto férrico (FeCl₃) a 26% por 5 minutos. Posteriormente, foi feita a filtração e transferência do extrato para um funil de separação com 20 mL de clorofórmio. Agitou-se cautelosamente e deixou-se decantar da camada clorofórmica. Lavou-se com H₂O destilada. Filtrou-se o extrato com sulfato de sódio anidro e transferiu-se para tubo de ensaio. Adicionou-se 2 mL de hidróxido de amônio a 40% (COSTA, 2001).

4.3.3 Pesquisa de cumarinas

Uma quantidade de planta seca foi colocada em um anel de vidro o qual foi tampado com uma lâmina sobre uma tela de amianto adaptada a um suporte de metal e aqueceu-se com lamparina. As lâminas foram trocadas repetidamente até o momento em que cessou a condensação da água. A partir de então, uma lâmina foi deixada em aquecimento até a formação de um sublimado. Dissolveu-se o sublimado com 0,5 mL de clorofórmio.

Em papel de filtro foi distribuído, em 2 pontos distintos, 5 gotas da solução clorofórmica. Após a evaporação do solvente, adicionou-se na mancha 1 uma gota de solução alcoólica de hidróxido de potássio 10%. Cobriu-se a mancha 2 com papel preto e submeteu-se a radiação UV 365 nm (COSTA, 2001).

4.3.4 Pesquisa de flavonoides

Foi preparado um extrato com aproximadamente 3 g de *B. erioclada* seca e fragmentada. Esta foi aquecida em banho-maria por 5 minutos com 20 mL álcool etílico 70%. Posteriormente, filtrou-se com algodão e transferiu-se

para 3 tubos de ensaios e 2 cápsulas de porcelana para executar as reações de identificação (SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, 2018).

4.3.4.1 Reação de *Shinoda*

Adicionou-se 2 mL do extrato hidroalcoólico em um tubo de ensaio e inseriu-se de três a quatro fragmentos de magnésio metálico. Adicionou-se 1 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado pelas paredes do tubo. Dependendo da sua estrutura química, cada flavonoide apresenta uma reação própria por ação do magnésio em presença do HCl concentrado, e pode levar até 15 min para desenvolvimento de coloração (SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, 2018).

4.3.4.2 Reação com cloreto de alumínio (AlCl_3)

Duas áreas diferentes de uma tira de papel de filtro foram umedecidas com o extrato hidroalcoólico obtido. Colocou-se sobre uma das regiões uma gota de solução etanólica de AlCl_3 5% e visualizou-se a fluorescência em câmara fechada com luz ultravioleta a 365 nm (COSTA, 2001).

4.3.4.3 Hidróxido alcalino

Em um tubo de ensaio foi colocado 3 mL do extrato aquoso e adicionou-se pelas paredes do tubo 1mL de solução aquosa de NaOH 1N (COSTA, 2001).

4.3.4.4 HCl concentrado

No mesmo tubo de ensaio, após a adição de base, adicionou-se pelas paredes do tubo 1 mL de HCl concentrado (COSTA, 2001).

4.3.4.5 Pesquisa de *Taubouk*

Em uma cápsula de porcelana adicionou-se 3 mL do extrato aquoso e aqueceu-se em banho-maria para a concentração do extrato até secura. Após resfriamento, o resíduo foi umedecido com cinco gotas de acetona e alguns cristais de ácido bórico e ácido oxálico. Evaporou-se novamente em banho

maria até secura, evitando aquecimento prolongado. Dissolveu-se o resíduo em 3 mL de éter etílico e observou-se sob a luz UV 365 nm (COSTA, 2001).

4.3.4.6 Pesquisa de *PEW*

Em uma cápsula de porcelana foi adicionada 3 mL do extrato aquoso e então levada ao banho-maria para concentração até secura. Adicionou-se 3 mL de metanol e transferiu-se o conteúdo para tubo de ensaio. Foi acrescentado ainda e alguns fragmentos de zinco metálico e três gotas de HCl concentrado (SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, 2018).

4.3.5 Pesquisa de saponinas

Para a preparação do extrato, foi fervida aproximadamente 5 g de partes aéreas floridas *B. erioclada* secas e fragmentadas com 10 mL de H₂O destilada por 2 minutos. Filtrou-se em algodão em um tubo de ensaio e agitou-se de forma enérgica no sentido vertical por 15 segundos. A altura da espuma formada foi observada durante 15 minutos (COSTA, 2001).

4.3.6 Pesquisa de taninos

Em um béquer, aproximadamente 2 g do material vegetal em estudo, seco e fragmentado foi fervido com 30 mL de H₂O destilada por 5 min. Em seguida, foi filtrado em algodão e resfriado. O extrato aquoso foi então distribuído para nove tubos de ensaio, corretamente identificados para as seguintes reações de identificação (COSTA, 2001):

4.3.6.1 Reação com a gelatina

Adicionou-se 0,5 mL; 1 mL e 2 mL do extrato aquoso em três tubos de ensaio e uma gota de HCl 10%. Em seguida, 2 mL de solução de gelatina a 2,5% (COSTA, 2001).

4.3.6.2 Reação com acetato de cobre

Adicionou-se 2 mL do extrato aquoso em um tubo de ensaio e dez gotas de solução aquosa de acetato de cobre a 4% (COSTA, 2001).

4.3.6.3 Reação com acetato de chumbo

Adicionou-se 2 mL do extrato aquoso em um tubo de ensaio e dez gotas de solução aquosa de acetato de chumbo 10% (COSTA, 2001).

4.3.7 Pesquisa de taninos hidrolisáveis

4.3.7.1 Reação com acetato ácido de chumbo

Colocou-se em um tubo de ensaio 3 mL do extrato aquoso e 5 mL de ácido acético glacial a 10% e 3mL de solução de acetato de chumbo a 10% (COSTA, 2001).

4.3.7.2 Reação com FeCl_3

Em um tubo de ensaio adicionou-se 2 mL do extrato aquoso e diluiu-se com 1 mL de H_2O destilada. Em seguida adicionou-se três gotas de solução de FeCl_3 1% (COSTA, 2001).

4.3.8 Pesquisa de taninos condensados

4.3.8.1 Água de bromo

Em tubo de ensaio adicionou-se 2 mL do extrato aquoso e cinco gotas de água de bromo (COSTA, 2001).

4.3.9 Teste para esteroides/triterpenoides (Lieberman-Burchard)

Em um tubo de ensaio contendo 2 mL de extrato adicionou-se 2 mL de clorofórmio, a seguir essa solução foi filtrada em um segundo tubo de ensaio. Foi adicionado 1 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente, e

acrescentou-se três gotas de ácido sulfúrico concentrado, tornou-se agitar observando o desenvolvimento de cores (COSTA, 2001).

4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES

4.4.1 Obtenção dos extratos brutos

Os extratos brutos (EB) foram obtidos por maceração. As partes aéreas secas foram trituradas e pesadas, e posteriormente foram deixadas em maceração com etanol absoluto por 7 dias. No entanto, os métodos de secagem foram diferentes, sendo um deles a solução do extrato bruto foi filtrada e atomizada em um Spray-dryer MSD 0.5 (Labmaq/Ribeirão Preto - SP). As condições operacionais utilizadas foram: fluxo de alimentação 0,15 mL min⁻¹, fluxo de ar 35 L min⁻¹, pressão de ar comprimido de 4 bar, temperatura de entrada do ar de secagem de 50 °C ± 5 °C e temperatura de saída do ar de secagem de 80 °C ± 5 °C. O cálculo do rendimento foi realizado seguindo a equação 4 reportada por Vasconcelos et al. (2005).

$$\eta = \frac{M_p}{M_s} \times 100 \quad (\text{EQUAÇÃO 4})$$

Onde: η = rendimento, M_p = massa do pó coletado, M_s = massa da planta seca

O outro extrato foi filtrado e posteriormente concentrado em evaporador rotativo com pressão reduzida à temperatura de 50 °C e 90 rpm até a redução a 1/5 de seu volume inicial e armazenado em frascos até o momento da partição.

4.4.2 Determinação do teor de sólidos

Alíquotas de 10 mL do extrato bruto foram colocadas em placas de petri, tendo estas, massas conhecidas. As placas foram levadas à secagem total em estufa a 60 °C e o teor de sólidos totais (g/mL) foi determinado pela verificação da massa dos extratos secos nas placas de Petri, após resfriamento em dessecador, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010).

4.4.3 Fracionamento do extrato bruto

O extrato bruto (30 g) foi particionado utilizando cromatografia em coluna sob pressão. Foram utilizados solventes em ordem crescente de polaridade hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. As quatro frações obtidas (hexânica FH, clorofórmio FCL, acetato FA e metanólica FM) foram rotaevaporadas e armazenadas em refrigeração (4°C) até o momento do uso. Durante o processo de partição ocorreu a precipitação de um composto amarelo na fração acetato de etila.

Este precipitado foi filtrado e submetido à análise espectrométrica para determinação da estrutura, para isso realizou-se RMN de ^{13}C e ^1H , utilizando o aparelho RMN Bruker DPX 600, operando a 4,7 Tesla, observando os núcleos de ^1H e ^{13}C à 200,13 e 50,62 MHz, respectivamente. A elucidação da estrutura foi realizada no departamento de Química (UFPR).

4.5 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

4.5.1 Extração do óleo essencial

O óleo essencial extraído de 100 g das partes aéreas da espécie em estudo foi determinado quantitativamente. A extração foi realizada por meio de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger (USP XXV, 2002), com duração de 6 horas. Após esse tempo, foi observada a quantidade de óleo extraído pela medição no tubo graduado. A porcentagem de óleo essencial existente na massa de 100 g das partes aéreas foi correspondente ao valor lido no tubo graduado. O material obtido foi estocado em tubos de vidro âmbar, e mantidos em temperatura de $4 \pm 0,5$ °C. O cálculo do rendimento foi realizado através da seguinte equação 5:

$$T\% = \frac{\text{volume do óleo (escala graduado do Clevenger)}}{\text{quantidade do vegetal (gramas)}} \times 100 = \quad (\text{EQUAÇÃO 5})$$

4.5.2 Identificação e quantificação dos compostos voláteis do óleo essencial

Uma alíquota do óleo essencial foi armazenada em eppendorf e mantida em freezer até o momento da análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).

A análise cromatográfica foi executada em aparelho Shimadzu® modelo GCMS-QP 2010 Plus equipado com coluna capilar Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Injetor em modo *splitless* a 250 °C, interface e fonte de íons a 300 °C. A janela de massas analisada foi entre m/z 40 e m/z 350, utilizando o gás Hélio como gás de arraste. Rampa de injeção para análise com temperatura do injetor em 250 °C, pressão da coluna de 20 psi, iniciando-se com temperatura de 50 °C por 5 minutos elevando-se para 200 °C a uma razão de 5 °C/min. Esta análise foi realizada no Departamento de Química (UFPR).

4.6 ESTUDO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Baccharis erioclada* DC.

4.6.1 Atividade tóxica em *Artemia salina* Leach

Os testes de *Artemia salina* foram realizados com o extrato bruto, frações e óleo essencial nas concentrações de 1000, 100 e 10 µL/mL. A diluição do extrato e das frações foram realizadas com 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) e o óleo essencial com 0,5% de Polissorbato 80.

O método utilizado foi descrito por Meyer et al. (1982) com adaptações de Petrobrás (1996) que determina a CL₅₀ em µg/mL de compostos isolados e extratos. Foi utilizada água do mar artificial, preparada com 30 g de sal marinho e 1.000 mL de água destilada. O pH foi ajustado com Na₂CO₃ para a faixa de 8-9, para evitar a morte das larvas que são sensíveis ao pH abaixo de 6 ou acima de 10,5 (LEWAN et al., 1992). Os ovos de *Artemia salina* (200 mg/400 mL) foram colocados em contato com a água do mar artificial e aerados por uma hora e então incubados em temperatura (27-30)°C por 48 horas, com iluminação constante. Para efeitos de controle, os náuplios foram avaliados frente aos solventes utilizados (DMSO 1% e Polissorbato 0,5%, ambos em salina). Como controle negativo (branco) foi utilizado solução salina e como controle positivo Dodecil sulfato de sódio (SDS) nas concentrações de 10, 20,

30, 40 e 50 µg/mL. Foram colocadas em cada tubo contendo a amostra e controles, 10 náuplios de *Artemia salina*, os quais foram novamente incubados em temperatura de (27-30)°C por 24 horas. Em seguida, foi realizada a contagem de náuplios imóveis. Os dados obtidos foram analisados pelo método estatístico Probitos (FINNEY, 1956) para a determinação dos valores de CL₅₀ e 95% de intervalos de confiança. Todos os testes foram realizados em triplicata, sendo consideradas amostras ativas as que CL₅₀ for menor que 1000 ppm (1000 µg/mL).

4.6.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

4.6.2.1 Microrganismos

Foram utilizadas cepas padrão (*American Type Collection Culture* - ATCC) da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), das Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922), de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) e do fungo leveduriforme *Candida albicans* (ATCC 10231).

4.6.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição

Para a determinação dos valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo. A diluição dos extratos brutos e frações foram realizadas com 2% de dimetilsulfóxido (DMSO) completadas com etanol 10% e o óleo essencial foi diluído com 5% de polissorbato 80.

Os testes foram realizados em caldo Mueller Hinton e caldo Mueller Hilton glicosilado contidos em placa “*Sensitive microtiter*” de 96 poços, esterilizada e usada em análises de ELISA.

Uma amostra de 20 µL de EB, frações e óleo essencial nas concentrações de 2.000 µg/mL, 1.000 µg/mL, 500 µg/mL e 250 µg/mL foi depositada em cada poço da placa contendo 170 µL de caldo Mueller Hinton e 10 µL da suspensão de microrganismos, obtendo-se um volume final de 200 µL em cada poço. Foi realizado controle do caldo, do caldo com bactérias e

controle com Clorexidina 10 mg/mL (Merthiolate®) junto com o microrganismo e o caldo.

As placas foram tampadas e incubadas a 35 °C por 24 horas. A leitura foi realizada em leitor de ELISA no comprimento de onda de 650 nm (LIMA et al., 2006, SANTOS et al., 2007). Foi considerada como CIM a menor concentração do extrato capaz de impedir 90% ou mais do crescimento microbiano.

4.6.3 Ensaios antioxidantes

4.6.3.1 Método da redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

A atividade antioxidante do extrato bruto e frações foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Sanches-Moreno et al. (1998).

Foram preparadas diferentes concentrações (1 a 0,0625 mg/mL) do extrato bruto e frações em metanol. Esse solvente também foi empregado na obtenção das diluições seriadas dos controles positivos: ácido ascórbico e rutina (1 a 0,0625 mg/mL) e na obtenção da solução de DPPH (0,1mM).

Em microplacas de 96 poços foram transferidos 20 µL das soluções do extrato bruto e frações de *B. erioclada* bem como dos controles positivos e do branco (metanol) e 100 µL da solução de DPPH. As placas foram homogeneizadas durante 1 minuto e a leitura foi realizada após 30 minutos de incubação no escuro à temperatura ambiente em leitor de microplacas (Biotek Instruments, Winooski, VT, EUA) no comprimento de onda de 517 nm.

A atividade antioxidante (AA) foi determinada sob a forma de porcentagem e calculada pela taxa de declínio da absorbância da solução de DPPH com os extratos ou padrões, após 30 minutos de reação, em relação à solução de referência (DPPH em metanol), de acordo com a equação 6:

$$\%AA = 100 - [(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}} / A_{\text{controle}}) \times 100] \quad (\text{Equação 6})$$

Onde, A é o valor de cada absorbância. A partir da porcentagem da atividade antioxidante obtida para cada concentração do EB e das frações foi construído um gráfico. A equação da reta obtida foi utilizada para o cálculo do

IC₅₀, substituindo o valor de Y por 50%. O valor de IC₅₀ encontrado representa a concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% da concentração de DPPH adotada.

4.6.3.2 Poder de redução (Azul da Prússia)

A avaliação do poder redutor foi realizada de acordo com Yen;Chen (1995) com modificações. Em um tubo de ensaio foi adicionado 1 mL de amostra, 2,5 mL de tampão fosfato (0,2Mol/L) e 2,5 mL de ferricianeto (1%) e incubou-se a 50°C por 20 minutos. Posteriormente foi adicionado 2,5 mL de ácido tricloroacético (10%) à mistura. Foi retirado 2,5 mL desta mistura e transferido para outro tubo de ensaio. Neste tubo de ensaio foi adicionado 2,5 mL de H₂O e 0,5 mL de FeCl₃. A absorbância foi realizada em 700 nm.

4.6.3.3 Método para a determinação das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Foi adicionado em tubos de ensaio 0,1 mL de uma solução das amostras EB, frações e óleo essencial na concentração de 0,3% em etanol, 0,4 mL de H₂O, 0,5 mL de solução de gema de ovo 5% (p/v) previamente preparada em solução de SDS 0,55% (dodecil sulfato de sódio), 50 µL de ABAP 0,035% (cloreto de 2,2'-azo-bis-2-amidinopropano), 1,5mL de ácido acético 20% (pH 3,5) e 1,5 mL de TBA 0,4% (ácido tiobarbitúrico) também preparada em solução de SDS 0,55%. Os tubos foram levados a banho-maria a 95 °C por 1 hora.

Após o resfriamento da solução, adicionou-se 1,5 mL de 1-butanol, para extração da fase orgânica. Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 min. Em seguida, foi realizada a leitura do sobrenadante em 532 nm. Como branco foi utilizado o 1-butanol. Como controle negativo, foi utilizada a mesma solução, sendo a amostra substituída por 0,1 mL de etanol. Como controle positivo, foi utilizada a mesma solução, sendo a amostra substituída por 0,1 mL de hidroxitolueno butilado (BHT) 0,3% em etanol. O teste foi realizado em triplicata (MORAIS, 2006).

Foi determinado o Índice Antioxidante das amostras em percentual (IA%), através da equação 7:

$$IA\% = [1 - (AbsA - AbsBranco / AbsC)] \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

Sendo: AbsA – absorbância da amostra; AbsBranco – absorbância do branco da amostra; AbsC – absorbância do controle.

4.6.3.4 Capacidade antioxidante total (Fosfomolibidênio)

A determinação da capacidade antioxidante total foi realizada pelo método de redução do complexo fosfomolibdênico (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). Em um tubo de ensaio foi adicionado 300 µL da amostra (EB, frações e óleo essencial) em solução etanólica a 200 µg/mL, juntamente com 3 mL do reativo (molibdato de amônio a 4 mmol/L, fosfato de sódio 28 mmol/L, ácido sulfúrico 0,6 mol/L). O tubo foi fechado hermeticamente e levado ao banho-maria a 95 °C por 90 min. O ensaio foi realizado em triplicata.

Após o resfriamento do tubo foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV/Vis SHIMADZU-1601 a 695 nm contra um branco (300 µL de etanol, acrescidos de 3 mL do reativo). Os padrões utilizados foram o ácido ascórbico, ácido gálico e a rutina a 200 µg/mL. Para efeitos de cálculo, o ácido ascórbico foi considerado como 100% de atividade antioxidante, conforme a equação 8.

$$\%AA = (A \text{ amostra} - A \text{ branco} / A \text{ ácido ascórbico} - A \text{ branco}) \times 100$$

(Equação 8)

Onde, A é o valor de cada absorbância.

4.7 DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS E FLAVONOIDES TOTAIS

4.7.1 Doseamento de polifenóis

Para determinação do teor de fenólicos totais, a amostra foi diluída em metanol (1000 mg mL⁻¹) e adicionado ao tubo de ensaio e este completado para 3,4 mL com água destilada, após total solubilização foi adicionado 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteu novamente homogeneizado e adicionado 0,4 mL de carbonato de sódio a 10%, agitado e depois 30 minutos de repouso em temperatura ambiente (SLINKARD; SINGLETON, 1977). Após este período,

foram realizadas as leituras em espectrofotômetro à 760 nm utilizando curva de calibração de ácido gálico nas concentrações de 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ como padrão, as leituras foram realizadas em triplicata. Os teores de fenólicos totais foram determinados em miligramas equivalente de ácido gálico (EG) por grama de extrato bruto, utilizando a equação 9 com base na curva de calibração:

$$y = 0,0392x - 0,057 \quad (\text{Equação 9})$$

$$R^2 = 0,9967$$

4.7.2 Doseamento de flavonoides totais

A amostra foi diluída em metanol ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) e foi adicionado a 2 ml de AlCl_3 2%. Após 60 minutos foram realizadas as leituras em espectrofotômetro à 420 nm utilizando curva de calibração de quercetina nas concentrações que variaram de 5 a 30 $\mu\text{g/mL}$ como padrão, as leituras foram realizadas em triplicata (CHANG et al., 2002). Os teores de flavonoides totais foram determinados em miligramas equivalente de quercetina (EQ) por grama de extrato bruto, utilizando a equação 10 com base na curva de calibração:

$$y = 0,0313x - 0,016 \quad (\text{Equação 10})$$

$$R^2 = 0,9997$$

4.8 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

As análises qualitativas e quantitativas do extrato bruto foram realizadas em cromatógrafo líquido da Varian Pro-star SYS-LC-240-E (Palo Alto, CA, EUA), provido de detector DAD, em comprimento de onda de 289 nm, equipado com coluna C18 *analytical column* (250 x 4,6 mm, 5 μm) mantida a 21 °C, conforme os parâmetros estabelecidos na TABELA 2.

TABELA 2 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS PARA O *FINGERPRINT* O DO EXTRATO BRUTO POR CLAE

CARACTERÍSTICAS	DESCRIÇÃO
Deteção	UV ($\lambda = 289 \text{ nm}$)
Fluxo	$1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$
Coluna	Varian C18 analytical column (250 x 4,6 mm, 5 μm)
Sistema fase móvel	A: água ultrapura ajustada para pH 3,0 com ácido fosfórico 0,1N B: metanol C: acetonitrila e água ultrapura na proporção 90:10 (v/v)
Volume de injeção	10 μL
Tempo de análise	25 minutos

FONTE: a autora (2018).

As corridas cromatográficas foram realizadas empregando-se modo de eluição gradiente. Na programação de 1-12 min utilizando a mistura de 70% de fase A, 27% de fase B e 3% de fase C (fluxo de $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$); de 12-16 min: 40% de fase A, 50% de fase B e 10% de fase C (fluxo de $1,1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$); 16-25 min: 20% de fase A, 50% de fase B e 30% de fase C (fluxo de $1,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), e finalizando em 25 min com 5% de fase A, 1% de fase B e 94% de fase C (fluxo de $1,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$).

Cerca de 1 mg de extrato bruto foi diluído em 2 mL de MeOH, foi sonificado por 5 minutos, filtrado a $0,45 \mu\text{m}$ e transferido para vial. O preparo da curva de calibração de hispidulina se deu a partir da diluição de uma solução de trabalho a $1 \mu\text{g/mL}$ de hispidulina em metanol de modo a fornecer cinco concentrações (21, 28, 35, 42 e $49 \mu\text{g/mL}$), preparadas em triplicata. Um volume de $10 \mu\text{L}$ de cada uma das soluções e amostras foi injetado na coluna cromatográfica.

O teor de hispidulina das amostras foi calculado a partir da equação da reta gerada pela curva analítica plotada levando-se em consideração os dados de concentração x área do pico das cinco concentrações de hispidulina.

4.8.1 Desenvolvimento e validação do método analítico por CLAE

A validação do método analítico foi baseada na legislação brasileira vigente para validação a Resolução da Anvisa RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017, e também normas internacionais como Q2 (R1) (2005) – *Validation of analytical procedures: text and methodology* (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

Dentro da classificação das categorias de métodos analíticos este método enquadra-se na categoria I que dispõe sobre testes quantitativos para

a determinação de princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias primas. Os ensaios preconizados para esta categoria são: especificidade, linearidade, intervalo, exatidão, robustez e precisão. O limite de detecção foi determinado para estabelecer uma referência mínima de detecção em função da concentração de composto.

O extrato utilizado para a validação foi o extrato bruto preparado de acordo com a necessidade de cada parâmetro.

4.8.2 Seletividade

A seletividade foi avaliada através da determinação da pureza dos picos individuais do EB comparando com o padrão.

4.8.3 Linearidade e faixa de trabalho

A linearidade foi determinada através do método de padronização externa em 5 níveis de concentração, os quais estão apresentados na TABELA 3. Destas soluções foram obtidas as curvas analíticas. As amostras para análise de linearidade foram preparadas, em triplicata, a partir de solução estoque do padrão e foram diluídas com metanol.

TABELA 3: CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NA AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE

Concentração [] µg/mL	Volume da solução mãe (µL)	Volume do metanol (µL)	Nível (%)
21	21	979	60
28	28	972	80
35	35	965	100
42	42	958	120
49	45	955	140

FONTE: a autora (2018).

As curvas de calibração foram equacionadas para se verificar a linearidade dentro do intervalo. Foi realizada a avaliação da associação linear entre as variáveis através dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2) e da avaliação da significância do coeficiente angular. Foi considerado como critério de aceitação um valor de r de no mínimo 0,99, coeficiente angular diferente de zero, utilizando um nível de significância de 5%.

4.8.4 Efeito matriz

De acordo com a RDC 166 de 2017, o efeito matriz deve ser determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a SQR do analito em solvente e com a amostra fortificada com a SQR do analito. Estão descritas na TABELA 4 as concentrações da amostra, padrão e solvente utilizados.

TABELA 4: CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS TRABALHADAS NO PARÂMETRO DE EFEITO MATRIZ

Nível	Nível %	Volume do EB (µL)	Volume do P (µL)	Volume do metanol (µL)	[] µg/mL	Volume final
1	60	200	24	776	24	1000
2	80	200	28	772	28	1000
3	100	200	35	765	35	1000
4	120	200	42	758	42	1000
5	140	200	49	751	49	1000

FONTE: a autora (2018).

Como critério de aceitação, foi adotado o nível de significância de 5% no teste de hipótese nula. Para análise estatística, foi utilizado o software Excel com o suplemento *ActionStat*.

4.8.5 Precisão

A precisão foi determinada de duas maneiras: repetibilidade (precisão intra-corrida) e precisão intermediária (precisão intercorrida). Para a repetibilidade, foram realizadas seis análises para a concentração do ponto central (100%), por um mesmo analista, mesmo equipamento, em curto intervalo de tempo. A precisão intermediária foi determinada também por seis análises da mesma amostra na mesma concentração, executada por outro analista, no mesmo equipamento em um intervalo de dois dias.

As médias com os respectivos desvios padrões e os coeficientes de variação foram calculados para as amostras. O Teste t de Student foi utilizado para comparação das médias.

4.8.6 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método de adição de padrão. Este ensaio consistiu na determinação da percentagem de erro relativo entre a concentração teórica (concentração do metabólito no extrato + adicional de padrão) e a concentração experimental do analito.

Nove soluções da amostra sem fortificação foram diluídas em metanol para a concentração de 7 mg/mL. Utilizando a curva de calibração, gerada no ensaio de linearidade, foi possível determinar a concentração inicial conforme indicado na TABELA 5.

As amostras de extrato bruto receberam um adicional de padrão dos metabólitos correspondente a 80, 100 e 120%. As soluções da amostra e do padrão de exatidão foram preparadas em triplicata nas concentrações conforme segue na TABELA 5 e analisadas também em triplicata.

TABELA 5: PREPARO DE AMOSTRAS PARA O ENSAIO DE EXATIDÃO

Nível (%)	Volume do EB (µL)	Volume do P (µL)	Volume do metanol (µL)	V final (µL)	[] mg/mL
80	200	28	772	1000	28
100	200	35	765	1000	35
120	200	42	758	1000	42

FONTE: a autora (2018).

4.8.7 Limite de detecção e quantificação

O LD foi determinado quando o sinal obtido, para o analito, apresentou altura de pico igual a 3 vezes o valor da relação sinal/ruído (S/N) e o LQ determinado quando o sinal obtido pelo analito apresentou altura de pico 10 vezes superior ao valor da relação (S/N).

4.8.8 Robustez

A robustez foi avaliada em triplicata para o ponto central da curva analítica. Foram utilizadas as ferramentas estatísticas Teste F e Teste t de Student para avaliar o comportamento dos dados frente a pequenas alterações, descritas na TABELA 6.

TABELA 6: CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DA ROBUSTEZ

Parâmetro	Condição original	Variação
Fluxo da fase móvel	1,0mL.min ⁻¹	0,9 mL.min ⁻¹ e 1,1 mL.min ⁻¹
Proporção da fase móvel	70/27/3	69/28/3 e 71/26/3
Volume de injeção	1,0 µL	0,9 µL e 1,1 µL

FONTE: a autora (2018).

4.9 DESENVOLVIMENTO DOS FILMES DE AMIDO

Foram preparados filmes usando como polímeros o amido e a polilisina e como agente plastificante o glicerol, nas concentrações apresentadas na TABELA 7.

TABELA 7: CONCENTRAÇÕES DOS POLÍMEROS EMPREGADOS NAS FORMULAÇÕES DOS FILMES

Materiais	F1	F2	F3	F4
Amido (solução a 10%)	20mL	30 mL	20mL	30mL
Polilisina (solução a 3%)	20 mL	10mL	-	-
Glicerol	4mL	4mL	4mL	4mL
Ácido acético	0,5mL	0,5mL	0,5mL	0,5mL

FONTE: a autora (2018).

Os filmes foram preparados pela técnica de evaporação do solvente (“*casting*”). Os materiais foram misturados nas concentrações determinadas na Tabela 7 e mantidos sob agitação a 90 °C por cerca de 20 minutos. Logo após, 10 mL das soluções filmogênicas foram vertidas em placa de petri, e levadas à estufa a 37 °C durante 24 horas.

O extrato bruto seco (3%) em *spray dryer* foi sonificado durante 30 minutos em água destilada antes de acrescentá-lo às formulações. Decorrido o tempo de sonicação, a solução filmogênica foi preparada e posteriormente sonicada por mais 30 minutos.

4.9.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES POLIMÉRICOS

4.9.2.1 Análise subjetiva

Esta análise refere-se à aparência do filme avaliada por observações táteis e visuais. Os filmes poliméricos obtidos devem apresentar superfícies homogêneas e contínuas. Para esta avaliação, foram utilizados parâmetros

estabelecidos por Gontard (1991), avaliando as seguintes características: continuidade (ausência de ruptura após a secagem), homogeneidade (ausência de partículas insolúveis ou bolhas de ar) e manuseabilidade (possibilidade de ser manuseado facilmente sem riscos de ruptura). Esses parâmetros foram também utilizados para a verificação da estabilidade dos filmes no tempo de 30, 60, 90 e 180 dias.

4.9.2.2 Análise por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (*Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy* SEM-FEG)

A avaliação morfológica da superfície e da secção transversal foi realizada em microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo MYRA3, (Tescan) e microscópio eletrônico de varredura VEGA3 (Tescan). Os filmes foram cortados e fixados em suporte metálico metalizados com ouro no equipamento SC7620 Mini Sputter Coater. As micrografias foram obtidas após a visualização das amostras, empregando voltagens de aceleração de 10 kV. O registro das imagens ocorreu por meio da utilização do *software* específico.

4.9.2.3 Avaliação por espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (IVTF)

Os filmes poliméricos foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier, em pastilha com KBr, empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2% m/m), no equipamento IR Prestige-21 (Shimadzu), 64 scans min^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} .

4.9.2.4 Espessura

A medida da espessura dos filmes foi realizada com micrômetro manual, com resolução de 0,001 mm (DIGIMESS), em 5 posições aleatórias para cada amostra.

4.9.2.5 Caracterização das propriedades mecânicas: teste tensão de ruptura dos filmes

Os testes foram realizados no Laboratório de Ensaios Mecânicos do curso de Engenharia de materiais da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Os filmes foram cortados nas dimensões de 50x20 mm e condicionados em dessecadores contendo solução salina de nitrato de magnésio pelo período de 48 horas, conforme os métodos e normas da *American Society for Testing and Material* (ASTM D-882-00, 2011). Após o condicionamento, os ensaios de tração foram realizados com o auxílio de uma máquina universal de ensaios mecânicos, marca Shimadzu AG-1, com capacidade de 10 kN, força máxima 100N, empregando velocidade de 10mm/min. As propriedades determinadas foram resistência máxima a tração (MPa), alongamento na ruptura (%) e módulo de elasticidade ou de Young (Mpa). As medidas foram realizadas em triplicata para cada formulação.

4.9.2.6 Determinação da taxa de transmissão de vapor de água

A transmissão do vapor de água pelos filmes foi avaliada segundo o protocolo descrito por Lin et al. (2013) e Antunes et al. (2015) com modificações.

Tubos de ensaio de vidro contendo 10 mL de água deionizada foram fechados com os filmes com o auxílio de uma fita veda rosca. Em seguida os tubos foram pesados e colocados em estufa a 37 °C. Filmes não vedados foram usados como controle. Em períodos pré-determinados (tempo zero, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 24 horas e 48h) os tubos foram pesados. A taxa de transmissão de vapor de água (TTVA) foi calculada pela seguinte equação 11:

$$TTVA = \frac{P_p}{A} \text{ (Equação 11)}$$

A

Onde: P_p é a massa de água perdida em 24h e A a área de abertura do tubo. Este teste foi realizado em quintuplicata.

4.9.2.7 Porosidade

A porosidade (P) dos filmes foi determinada segundo o método de Antunes et al. (2015) com modificações. Este método baseia-se na quantidade de solvente absorvida por fragmentos dos filmes durante a imersão. Os filmes foram seccionados (2 cm x 2 cm) e deixados imersos em etanol 95% durante 1 hora. Após o período de imersão, a espessura dos filmes foi medida com auxílio de um micrômetro. Este teste foi realizado em triplicata.

O valor de P foi calculado a partir da equação 12:

$$P\% = \frac{P_u - P_s}{d_{\text{etanol}} V_{\text{filme}}} \times 100 \quad (\text{Equação 12})$$

Onde P_u e P_s são as massas das amostras úmidas e secas, respectivamente, d_{etanol} a densidade do etanol e V_{filme} o volume dos filmes úmidos (valor obtido através da espessura).

4.9.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do filme polimérico

A atividade antimicrobiana dos filmes poliméricos foi testada por disco-difusão em ágar. Foram utilizadas placas contendo Ágar Mueller- Hinton, nas quais foi semeada a suspensão bacteriana, com auxílio de swab estéril. Discos de 0,5 cm de diâmetro foram recortados do filme polimérico e depositados no centro das placas semeadas. As placas foram incubadas à $\pm 3^\circ\text{C}$ por 24h, e ao fim da incubação foi observada a presença ou não de halo de inibição sobre o meio. Foram utilizadas cepas padrão (*American Type Collection Culture* - ATCC) da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), das Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922), de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) e do fungo leveduriforme *Candida albicans* (ATCC 10231).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MATERIAL VEGETAL

5.1.1 Determinação de umidade e cinzas

Os parâmetros de análise do teor de água e cinzas totais foram determinados pela primeira vez para a espécie *B. erioclada* e estão descritos na TABELA 8. De acordo com a Farmacopéia Brasileira (2019), essas análises tem grande importância para o controle de qualidade e identificação de impurezas na amostra.

TABELA 8 - DETERMINAÇÃO DE UMIDADE E CINZAS ENCONTRADAS PARA *Baccharis erioclada* DC.

PARÂMETROS	VALORES OBTIDOS (%)
Umidade	9,0 ± 0,23
Cinzas totais	6,5 ± 0,28

FONTE: a autora (2018).

O método com radiação infravermelha permite a obtenção do percentual de umidade através de um gerador de funções acoplado a uma balança digital. A amostra é colocada num prato de alumínio, sob uma câmara que protege a balança do calor gerado através de um colchão de ar, para que a leitura da balança não seja prejudicada pelos valores liberados da amostra (BORGES et al., 2005). O valor obtido neste ensaio foi de 9%. O valor máximo permitido descrito na Farmacopeia Brasileira (2010) é de até 12%. Neste sentido, o valor apresentado está dentro do limite estabelecido.

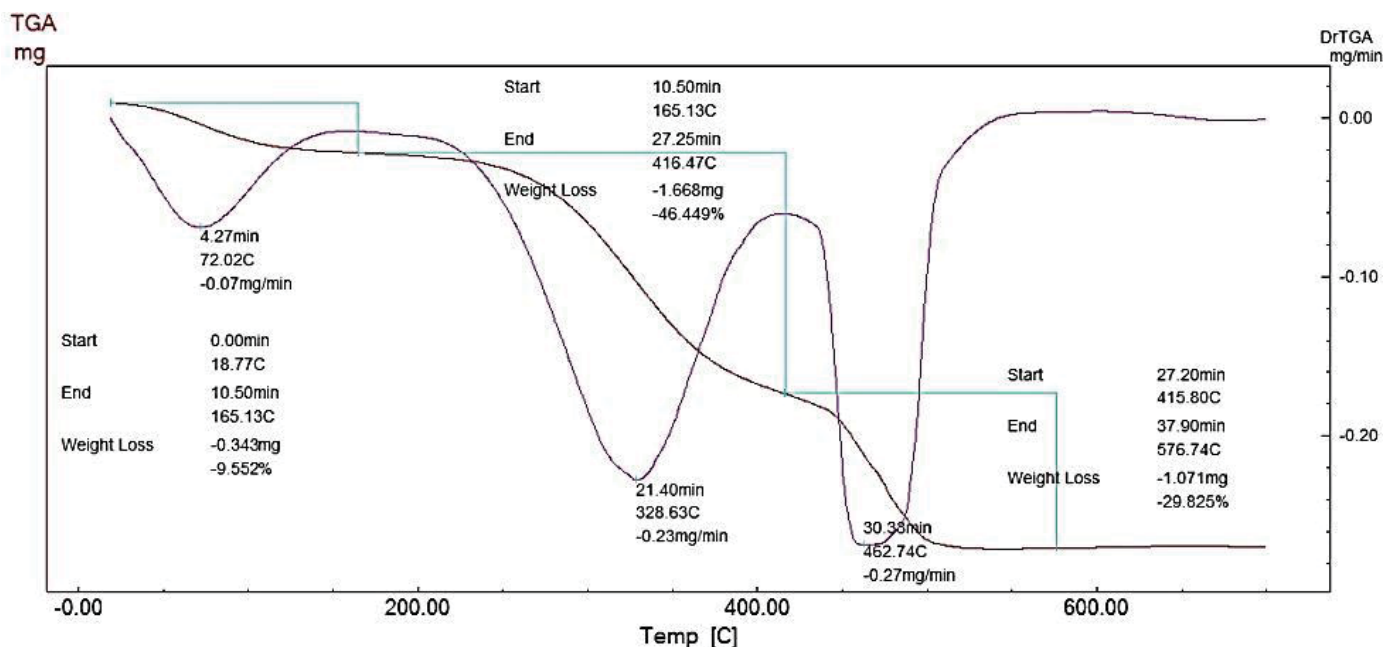
Apesar das drogas vegetais serem produtos orgânicos elas também apresentam componentes de natureza inorgânica, tais como carbonatos, fosfatos e cloretos. Estes componentes inorgânicos que fazem parte da constituição da droga são denominados de intrínsecos. A determinação do resíduo pela incineração ou cinzas é um ensaio utilizado para verificar o conteúdo inorgânico da matéria analisada. Assim, o material vegetal calcinado à alta temperatura tem toda a sua matéria orgânica convertida em CO₂, restando somente constituintes minerais em forma de cinzas. O resultado obtido foi de 6,5%. Segundo a Farmacopeia Brasileira (2019) a especificação para o teor de cinzas é de 8%.

5.1.2 Estudo termoanalítico

Os percentuais de variação de massa estão descritos na FIGURA 5. A amostra analisada consistiu na planta seca fragmentada e apresentou um decaimento na porcentagem de massa até os primeiros 100 °C devido à perda de umidade durante a análise. A amostra da droga vegetal perdeu 9,55% de sua massa, quando comparado com método de radiação infravermelha a amostra apresentou 9% de umidade. Uma das aplicações analíticas da TG é determinar os teores de umidade de amostras por isso, é utilizada no controle biológico para monitorar o armazenamento (WENDLANDT, 1986; FORD; TIMMINS, 1989).

A curva de TG da amostra pulverizada de *B. erioclada* está representada na FIGURA 5. Com relação à droga vegetal pulverizada, pode-se verificar que apresentaram mais 2 eventos após a perda de umidade. O primeiro entre 178-412 °C com perda de massa de 46,44%. O segundo entre 412-562 °C com perda de massa de 29,82%. Esse dado revela o início da decomposição térmica da amostra em material carbonáceo.

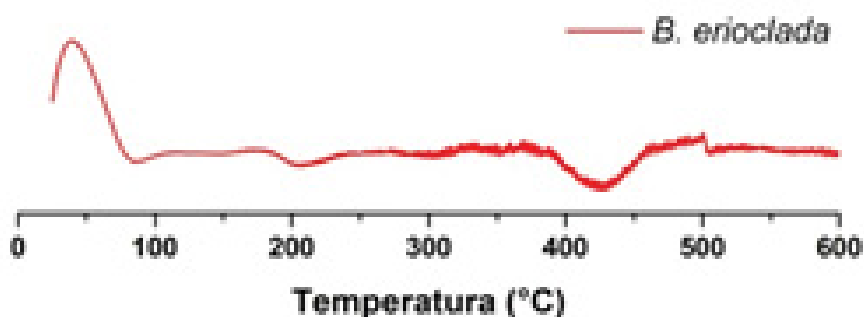
FIGURA 5 - CURVAS DE TG/TGA DE *B. erioclada*PULVERIZADA



FONTE: a autora (2018).

Em relação à calorimetria exploratória diferencial (DSC) (FIGURA 6), a amostra analisada apresentou um discreto evento endotérmico de 20 a 100 °C referente à perda de umidade. Tal fato pode ser confirmado por meio da análise das curvas termogravimétricas. A amostra também apresentou um evento endotérmico entre 195 e 210 °C.

FIGURA 6 - CURVA DE DSC DE *B. erioclada* PULVERIZADA.



FONTE: a autora (2018).

B. erioclada exibiu um evento endotérmico em 423 °C e um evento exotérmico a partir de 470 °C em decorrência da degradação térmica.

Os eventos observados na droga vegetal seca podem se referir a degradação dos compostos fitoquímicos encontrados na amostra. Portanto, é importante ressaltar que caso essa amostra seja submetidos a temperaturas que ultrapassem esse limite térmico pode haver degradação de seus metabólitos secundários, os quais podem alterar a atividade biológica esperada (ARAÚJO et al., 2006).

Acima de 600 °C pode-se encontrar o teor de cinzas que corresponde aos sais minerais ou impurezas contidas na amostra. Além da umidade, a termogravimetria pode ser utilizada para a determinação do teor de cinzas como indicativo da quantidade de sais minerais e possíveis adulterações do material vegetal com compostos inorgânicos (ARAÚJO et al., 2006).

Como a matriz vegetal é complexa, por apresentar uma composição química ampla e diferenciada, o comportamento cinético é diversificado para cada espécie, e em geral, reflete o comportamento cinético de suas substâncias majoritárias (ARAÚJO et al., 2006).

Os resultados obtidos foram descritos pela primeira vez e permitiram a caracterização do perfil de degradação térmica *B. erioclada*.

A pequena quantidade de amostra utilizada, a rapidez de resultados e a limpeza da técnica tornam a termogravimetria uma técnica valiosa para a padronização de matérias-primas vegetais que poderão ser utilizadas nos medicamentos fitoterápicos.

5.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA

A pesquisa fitoquímica preliminar permite fazer a detecção dos principais grupos de metabólitos secundários presentes na espécie em estudo, buscando também os marcadores químicos da espécie, dados que auxiliam no controle de qualidade, também servindo de base para a purificação, isolamento, caracterização e síntese de compostos. Os resultados obtidos estão descritos na TABELA 9.

TABELA 9 - RESULTADO DA PESQUISA FITOQUÍMICA

METABÓLITO SECUNDÁRIO	TESTE	RESULTADO
ALCALOIDES	Draggendorf	-
	Meyer	-
	Bouchardat	-
ANTRADERIVADOS	Livres	+ (Antraquinona)
	O-heterósido	+ (Antrona)
	C-heterósido	-
FLAVONOIDES	Shinoda	+
	Cloreto de alumínio	+
	Taubouk	+
	Pew	+
	Hidróxido alcalino	+
	HCl concentrado	+
TANINOS	Gelatina	+
	Acetato de cobre	+
	Acetato básico de chumbo	+
TANINOS HIDROLISÁVEIS	Acetato básico de chumbo	+
	Cloreto férrico	-
TANINOS CONDENSADOS	Água de bromo	+
CUMARINAS	Sublimação e fluorescência	-
SAPONINAS	Teste da espuma	+
ESTEROIDES	Lieberman-Burchard	+

FONTE: a autora (2018).

NOTA: (+) presença, (-) ausência.

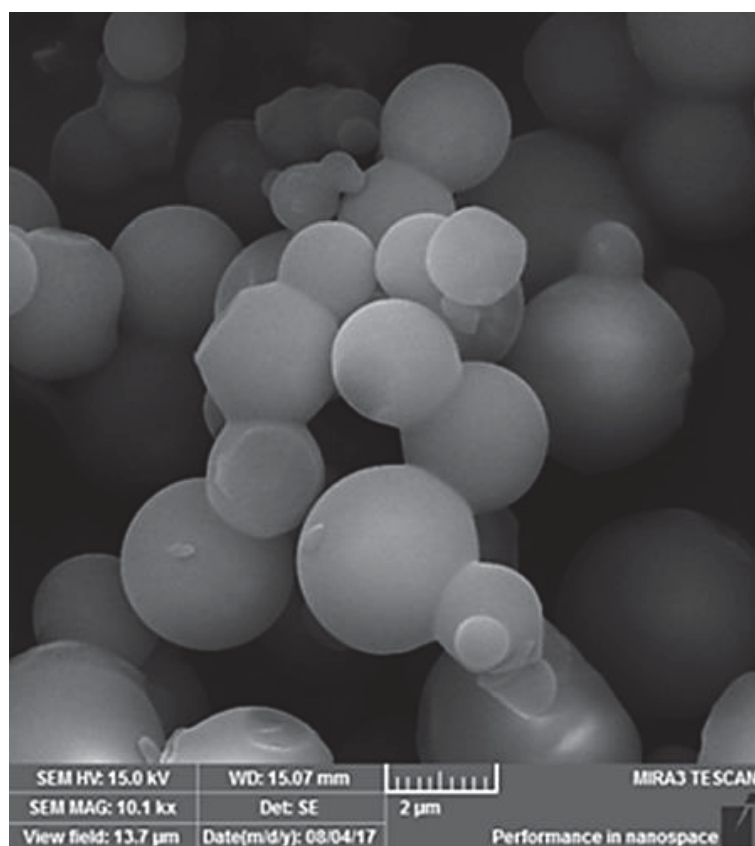
Os flavonoides juntamente com os diterpenos são os maiores grupos químicos em *Baccharis* e são descritos como marcadores quimiotaxionômicos para os mais baixos níveis hierárquicos de Asteraceae (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATI, 2005). Diversos estudos têm demonstrado a presença de estruturas diferenciadas de flavonoides em *Baccharis* (EMERENCIANO, 2001; SILVA et al., 2006). Os resultados obtidos no *screening* fitoquímico condizem com a literatura para o gênero *Baccharis*.

5.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES

5.3.1 Obtenção do extrato bruto

Visando melhorar as características tecnológicas dos filmes contendo extrato optou-se pela secagem através de *spray dryer*. Foi obtido aproximadamente 10,685% de rendimento, a partir de 100 g de planta seca. A morfologia das micropartículas obtidas é evidenciada na FIGURA 7 por Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (FEG).

FIGURA 7 - ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO EXTRATO BRUTO EM FEG.



FONTE: A autora (2018).

Os extratos secos têm grande importância para a indústria farmacêutica, principalmente na produção de medicamentos fitoterápicos. Dentre suas vantagens estão: maior facilidade em manipulá-lo, padronização mais simples, estabilidade química, físico-química e microbiológica potencializada e maior concentração de compostos ativos. Essas vantagens conferem maior segurança e eficácia terapêutica para o produto (TEIXEIRA; BASSANI, 2007; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). O processo de secagem por *spray dryer* se destaca na produção de extratos secos, entretanto apresenta como desvantagem o baixo rendimento.

Diversos estudos são descritos na literatura sobre a produção de extratos secos. Na grande maioria desses trabalhos, na etapa de desidratação, foi utilizado o processo por *spray dryer*. Vasconcelos et al., (2005) verificaram a influência da temperatura de entrada e a concentração de Aerosil, na obtenção de extratos secos de *Schinus terebinthifolius* Raddi. O resultado mostrou que à medida que a temperatura e a concentração de Aerosil aumentam, a umidade residual e higroscopicidade dos extratos decrescem. Silva-Júnior e colaboradores (2006) discutiram sobre a obtenção do extrato fluido de *Symphytum officinale* L. e posterior secagem por nebulização, e a caracterização físico-química por técnicas termogravimétricas, espectroscópicas e cromatográficas. Como resultado, os autores verificaram que o processo de secagem não influenciou as características dos constituintes do extrato seco em relação ao extrato fluido pelas técnicas utilizadas.

O extrato bruto preparado e submetido à rotaevaporação apresentou cerca 5,3% de rendimento a partir de 30 g de planta seca. Em diversos estudos essa metodologia é adotada (SANTOS et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016; BETIM, 2016).

5.3.2 Determinação do teor de sólidos

Da mesma forma que os ensaios físico-químicos, o teor de sólidos de extratos é aplicado como um parâmetro de controle de qualidade dos extratos vegetais. No entanto, não há padrões estabelecidos para valores aceitáveis de teor de sólidos de extratos, pois a descrição do teor é inédita a essa espécie.

Conforme metodologia descrita, o teor de sólido total (g/mL) do extrato bruto etanólico de *B. erioclada* foi de $0,3579 \pm 0,002$.

5.3.3 Rendimento das frações

O rendimento das frações, com relação ao EB é demonstrado na TABELA 10.

TABELA 10 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES

Fração	Massa (g)	Porcentagem (%)
FH	0,604	2,0
FCL	3,508	11,7
FAE	0,156	0,52
FMe	0,212	0,70

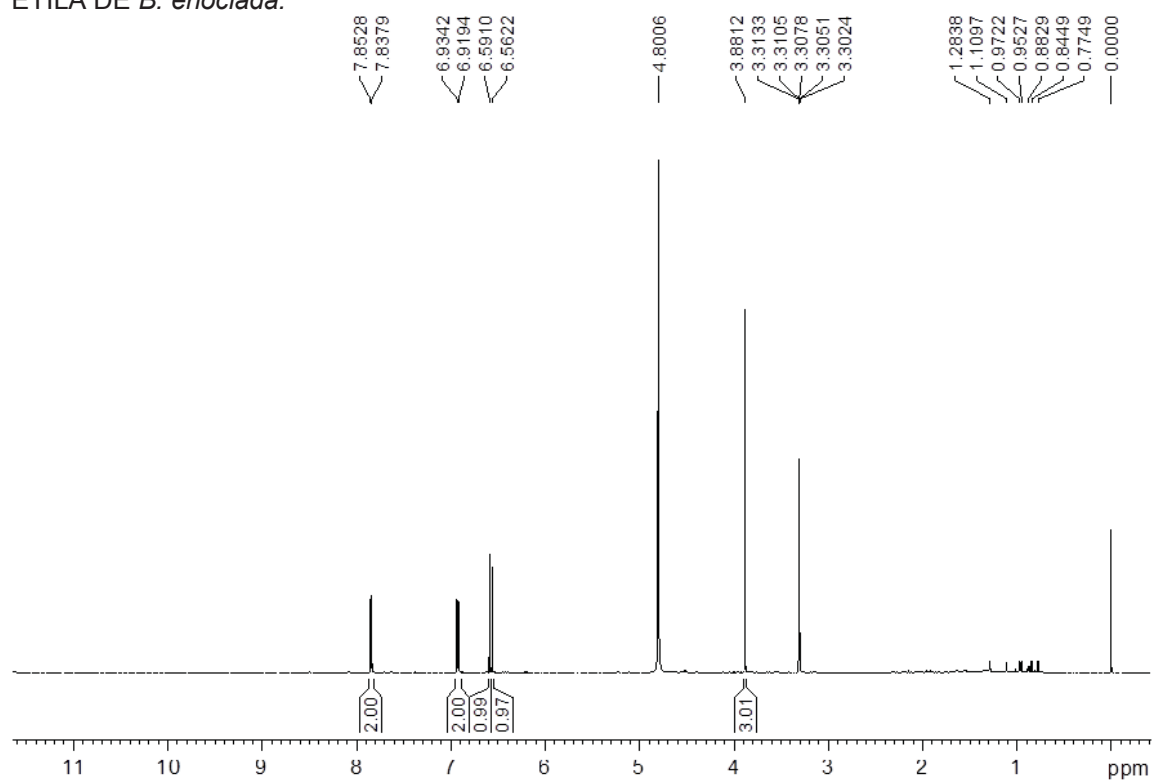
Fonte: A autora (2018).

Nota: FH = Fração hexânica; FCL= Fração clorofórmio; FAE= Fração acetato de etila; FMe = Fração metanólica.

5.3.4 IDENTIFICAÇÃO DO PRECIPITADO

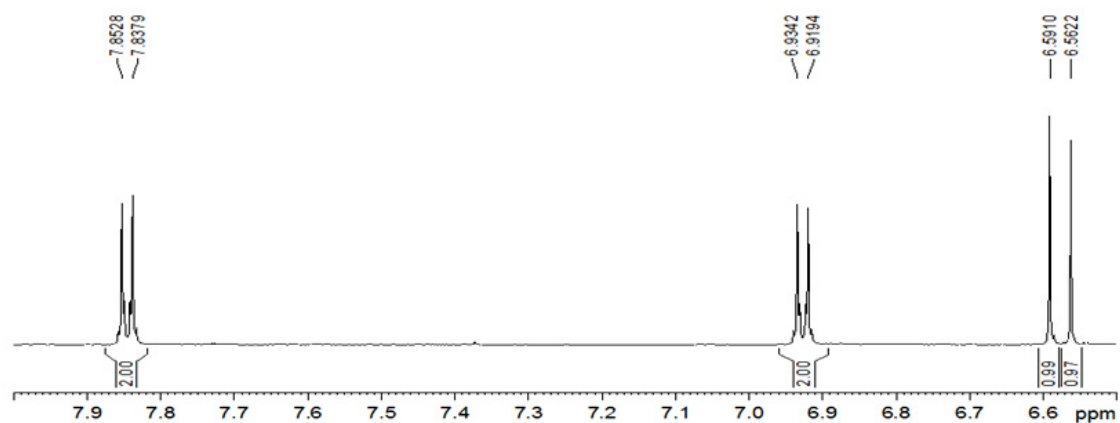
Foi possível identificar o composto isolado a partir da fração acetato de etila das partes aéreas da espécie *B. erioclada* analisando os dados obtidos no espectro de ^1H (FIGURA 8 e 9 e TABELA 11), os dados espectrais e sua comparação com dados de literatura sugerem se tratar da flavona hispidulina (FIGURA 10).

FIGURA 8 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H (600 MHz, CD_3OD) DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *B. erioclada*.



FONTE: a autora (2018).

FIGURA 9 - AMPLIAÇÃO DE ESPECTRO DE RMN DE ^1H



FONTE: a autora (2018).

TABELA 11 - DADOS DE RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ da FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *B. erioclada*

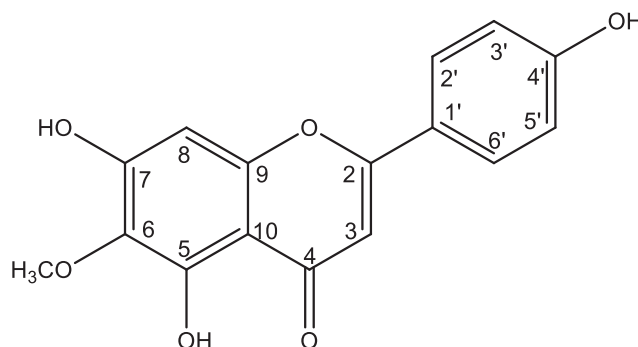
Posição	Hispidulina	
	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^{13}C (δ) ^{a,b}
2		166,4
3	6,59 (1H, s)	103,5
4		184,2
5		-
6		133,7
7	6,56 (1H, s)	158,9
8		95,3
9		154,7
10		105,8
1'		123,4
2'/6'	7,84 (1H, <i>d</i> , 8,8)	130,0
3'/5'	6,92 (1H, <i>d</i> , 8,8)	117,5
4'		162,8
6-OCH ₃	3,88 (3H, s)	61,4

FONTE: a autora (2018).

NOTA:^aExperimento a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CD_3OD , utilizando o TMS como padrão interno. ^bMultiplicidades determinadas pelos mapas de correlação HSQC e HMBC. (δ) Deslocamentos em ppm.

É possível notar a presença de dois dubletos, em 7,94 e 6,92 ppm, com perfil e constante de acoplamento característicos da presença de anel para-dissubstituído na molécula (FIGURA 10 E TABELA 11). Os simpletos estão desblindados (6,59 e 6,56 ppm) e sugerem a presença de grupamento retirador de elétrons ligados próximos a eles (i.e. grupamento hidroxila e carbonila). Nota-se ainda a presença de um simpleto com integral referente a 3 átomos de hidrogênio e deslocamento químico em 3,88 ppm característico de grupos metoxila.

FIGURA 10 - ESTRUTURA QUÍMICA DA FLAVONA HISPIDULINA



FONTE: adaptado de Herrerias et al. 2010.

A hispidulina é um flavonoide encontrado em muitas plantas a exemplo de *Grindelia argentina* Bertero, *Arrabidaea chica*(Bonpl.) Verl., *Saussurea acrophila* Diels, *Crossostephium chinense* (A.Gray ex L.) Makino, *Artemisia* L. em espécies de *Salvia* L.(PATEL; PATEL, 2016) e também em espécies de *Baccharis* como *B. crispa* (SOICKE, 1987; NAKASUGI; KOMAI, 1998) e *B. linearifolia* (Lam.)Pers. (MOREIRA et al., 2003).

Diversos estudos descrevem suas várias atividades biológicas. Thitilertdech, Rowan, e Guy (2015) detectaram absorção tópica de hispidulina utilizando creme e loção como veículo, sugerindo que estes compostos são potencialmente ativos na medicina tradicional tailandesa para o tratamento de uma ampla gama de doenças de pele. Os efeitos inibitórios dependentes da dose sobre a peroxidação lipídica foi descrito por Yuting e colaboradores (2006); atividade pró-oxidante por estimular a degradação da desoxirribose num sistema contendo Fe⁺³ EDTA na presença de H₂O₂; atividade antioxidante *in vivo* promovendo inibição da hepatotoxicidade ocasionada por bromobenzeno neutralizando os efeitos da depleção de glutathione, de maneira semelhante a observada com N-acetilcisteína (FERRANDIZ, et al., 1994). Patel e Patel (2016) em uma recente revisão relatam os efeitos da hispidulina no sistema nervo central, sistema renal, sanguíneo e na inflamação.

5.4 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial extraído das partes aéreas floridas de *B. erioclada* por hidrodestilação apresentou cor amarelo clara, aroma característico e densidade menor que a da água. O rendimento foi de 0,4% em relação ao peso do

material seco. O rendimento de óleos essenciais de espécies de *Baccharis* geralmente é baixo, tais como, 0,17% para *B. megapotamica* Spreng. e *B. anomala* DC. (BUDEL et al., 2012), 0,5% para *B. articulata* (Lam.) Pers., 0,3% para *B. oxyodonta* DC. (AGOSTINI et al., 2005).

Segundo Budel et al., (2018), o rendimento de OE foi de 0,58% em *B. microdonta*, 0,93% em *B. pauciflosculosa*, *B. punctulata* apresentou 0,29%, 0,59% para *B. reticularioides* e *B. sphenophylla* com 0,53%. De acordo com a literatura (MALIZIA et al., 2005), o rendimento de OE nas espécies de *Baccharis* variou entre 0,08 a 2,82%. *B. obovata* Hook. e Arn. apresentou o maior rendimento, enquanto o menor conteúdo foi alcançado para *B. lateralis* Baker (sin. *B. schultzii* Baker), coletados na Argentina e no Brasil, respectivamente (LAGO et al., 2008).

O cromatograma obtido a partir da análise de CG/EM do óleo essencial de *B. erioclada* está representado na FIGURA 11. A identificação dos compostos foi efetuada por comparação com os espectros da biblioteca NIST 2014 (banco de dados do sistema) e por comparação com espectros de referências bibliográficas descritos por Adams (2007). Os compostos químicos identificados no óleo essencial, por análise em CG/EM estão descritos na TABELA 12.

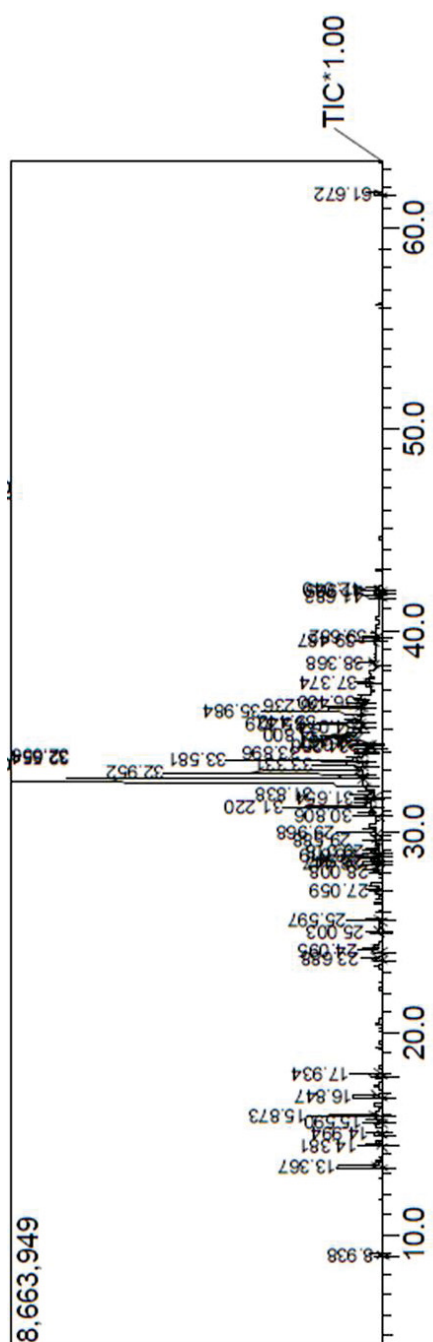
FIGURA 11 - ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DE *B. erioclada*

TABELA 12 - COMPOSTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS NA ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL DAS PARTES AÉREAS DE *B. erioclada*.

Composto*	Classe química	RI	% RA	Identificação
Limonene	M	1029	0.17	RI, MS
Pinocarveol <trans->	OM	1139	1.29	RI, MS
Pinocarvone	OM	1164	0.71	RI, MS
Terpien-4-ol	OM	1177	0.33	RI, MS
Terpineol <α->	OM	1188	0.50	RI, MS
Myrtenol	OM	1195	2.89	RI, MS
Carveol <trans->	OM	1216	0.73	RI, MS
Carvone	OM	1243	0.97	RI, MS
Ylangene <α->	S	1375	0.62	RI, MS
Bourbonene <β->	S	1388	0.79	RI, MS
Caryophyllene <(E)->	S	1419	1.15	RI, MS
Humulene <α->	S	1454	0.29	RI, MS
Gurjunene <γ->	S	1477	0.25	RI, MS
Himachalene <γ->	S	1482	0.55	RI, MS
Vetispirene <α->	S	1490	0.44	RI, MS
Viridiflorene	S	1496	0.74	RI, MS
Murolene <α->	S	1500	0.63	RI, MS
Epizonarene	S	1501	0.18	RI, MS
Cadinene <δ->	S	1523	1.56	RI, MS
Calacorene <α->	S	1545	0.81	RI, MS
Palustrol	OS	1568	1.01	RI, MS
Turmerone <ar-dihydro->	OS	1595	27.96	RI, MS
Fokienol	OS	1596	13.47	RI, MS
Ledol	OS	1602	9.78	RI, MS
Sesquithuriferol	OS	1605	2.16	RI, MS
Cubenol <1-epi->	OS	1628	0.88	RI, MS
Cadinol <α->	OS	1654	0.71	RI, MS
Gymnomitrol	OS	1660	2.63	RI, MS
Santalol <(7)- α->	OS	1675	5.35	RI, MS
Ishwarone	OS	1681	1.57	RI, MS
Tetracosane <n->	AH	2400	0.48	RI, MS
Total (identificado)			81.60	
(M) Monoterpenos hidrocarbonados (1)			0.17%	
(OM) Monoterpenos oxigenados (7)			7.42%	
(S) Sesquiterpenos hidrocarbonados (12)			8.01%	
(OS) Sesquiterpenos oxigenados (10)			65.52%	
(AH) Hidrocarbonetos alcanos (1)			0.48%	

FONTE: A autora (2018).

NOTA: RI, índice de retenção; RA, área relativa.

A análise por CG-MS do óleo essencial levou à identificação de 31 compostos diferentes (TABELA 13), representando 81,60% do total de óleo

essencial das partes aéreas de *B. erioclada*. A principal classe de compostos foi sesquiterpenos formados por sesquiterpenos oxigenados (62,52%) e hidrocarbonetos sesquiterpenos (8,01%). Várias espécies de *Baccharis* apresentaram sesquiterpenos como principais compostos de OE (AGOSTINI et al., 2005; BUDEL et al., 2012; PEREIRA et al., 2016; BOGO et al., 2016; CAMPOS et al., 2016; BUDEL et al., 2018). No entanto, Agostini e colaboradores (2005) observaram predomínio de compostos monoterpenos no óleo essencial de *B. uncinella*.

No presente estudo, *B. erioclada* apresentou turmerona (27,97%), fokenol (13,47%), ledol (9,78%) e santalol (5,35%) como os principais compostos do OE. Diferentes composições químicas foram encontradas para esta espécie coletada em Campos do Jordão, São Paulo (feminino/masculino): β -pineno (21,44% / 1,16%), limoneno (15,16% / 2,68%), β -cariofileno (4,21% / 10,70%), espatulenol (6,61% / 12,57%) (FERRACINI et al., 1995). Embora a composição química esteja relacionada às condições sazonais e influências ambientais (HEINZMAN; SPITZER; SIMÕES, 2017), é importante investigar se as variações na composição do OE podem estar ligadas a diferentes quimiotipos de *B. erioclada*.

Nesse contexto, os compostos majoritários de três amostras diferentes de *B. milleflora* foram o espatulenol (16,2% e 25,3%) presente em duas amostras e β -pineno com teor de 34,2% na terceira amostra (PEREIRA et al., 2016). Os principais compostos encontrados no OE de *B. dracunculifolia* DC. e *B. uncinella* DC. apresentaram níveis entre 18,76 a 27,45% para α -pineno e 12,96 a 14,02% para E-nerolidol (FABIANE et al., 2008). No entanto, Boix et al. (2010) encontraram verbenona (10,1%), mirceno (10,2%), 1,8-cineol (10,4%) e cânfora (25,2%) como os principais compostos em *B. dracunculifolia*. Essas diferenças na composição química reforçam a importância da caracterização do óleo essencial por CG-EM, a fim de estabelecer uma correlação entre a composição química e as atividades biológicas.

Além disso, o OE de *B. erioclada* possui quatro compostos principais com maior concentração quando comparado aos demais, os quais estão presentes apenas em traços, sendo estes compostos fundamentais para a ação farmacológica dos demais (BAKKALI et al., 2008; GALINDO et al., 2010). O principal composto identificado no OE de *B. erioclada* foi a turmerona. Este

composto mostrou atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus* e atividade larvívica em *Anopheles gambiae*, vetor da malária (AJAIYEOBA et al., 2008; FERREIRA et al., 2013).

5.5 ESTUDO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Baccharis erioclada* DC.

5.5.1 Atividade tóxica em *Artemia salina* Leach

A avaliação de toxicidade aguda em *Artemia salina* estabelece pela primeira vez um parâmetro para a espécie, uma vez que não foram encontrados relatos de ensaios ecotoxicológicos anteriores para se estabelecer comparações.

Esta técnica consiste em um ensaio preliminar rápido, de baixo custo, boa eficiência, requer pequena quantidade de amostra (2-20 mg). Este teste vem sendo utilizado na triagem de agentes antitumorais *in vivo* e pesticidas provenientes de espécies vegetais. Alguns estudos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades antifúngica, viruscida, antimicrobiana, tripanossomicida e parasiticida (SIQUEIRA et al., 1998; GHISALBERTI, 2008).

De acordo com Meyer et al., (1982), podem ser consideradas tóxicas as amostras que apresentam $CL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$. Já Amarante e colaboradores (2011) descreveram uma relação entre o grau de toxicidade em *Artemia salina* e a correlação da CL_{50} mais detalhada: a) baixa toxicidade ($CL_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$); b) moderada toxicidade ($100 \mu\text{g/mL} < CL_{50} < 500$).

Neste sentido, pode-se observar que as amostras do EB, frações e óleo essencial não demonstraram toxicidade frente ao microcrustáceo uma vez que todas apresentaram valores acima de $1000 \mu\text{g/mL}$.

Moreira et al (2003) em seu trabalho verificou que os extratos em clorofórmio e em metanol de folhas da espécie *B. pseudotenuifolia* Malag. apresentaram toxicidade ($TAS < 1000 \text{ ppm}$), sendo que a maior atividade foi do extrato clorofórmico no qual foi detectada a presença do triterpeno ácido oleanólico. Esse resultado vai ao encontro do reportado por Montanher et al. (2000) que constatou maior atividade toxicidade nos extratos clorofórmicos das espécies *B. ligustrina* DC. e *B. platypoda* DC. Kubo e Matsumoto (1984) relataram que o ácido oleanólico encontrado nas folhas de *B. linearis* (Ruiz & Pav.) pode atuar como uma forma de proteção contra microrganismos.

5.5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), os resultados estão descritos na TABELA 13.

TABELA 13 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E DO ÓLEO ESSENCIAL DE *B. erioclada*.

Microrganismo	Amostras (µg/mL)					
	EB	FH	FC	FAE	FM	OE
<i>E. coli</i>	2000	2000	2000	2000	2000	1000
<i>P. aeruginosa</i>	2000	2000	2000	1000	2000	2000
<i>S. aureus</i>	1000	2000	2000	2000	2000	2000
<i>C. albicans</i>	2000	2000	2000	2000	2000	1000

FONTE: A autora (2018)

NOTA: (EB) Extrato Bruto, (FH) Fração Hexano, (FC) Fração Clorofórmio, (FAE) Fração Acetato de Etila, (FM) Fração Metanólica, (OE) Óleo essencial.

A microdiluição em caldo é uma adaptação da técnica de macrodiluição. Apresenta como vantagem em relação à macrodiluição, a quantidade de amostra a ser testada, pois este método envolve o uso de pequenos volumes de caldo colocados em placas com poços de fundo redondo ou cônico estéreis, próprias para microdiluição (ALVES et al., 2008). A partir desta metodologia é possível determinar a CIM, ou seja, a menor concentração da amostra capaz de inibir completamente o crescimento do organismo teste (MADIGAN et al., 2010).

Esta técnica também apresenta alguns inconvenientes como a precipitação de compostos presentes em alguns extratos, e a coloração do extrato em concentração alta que poderão interferir na análise e adesão de células de alguns microrganismos à base do poço. No entanto, essa técnica ainda é considerada como a mais adequada. Isto se deve a maior sensibilidade que a técnica apresenta e o uso de quantidade mínima de amostra, a qual possibilita um maior número de réplicas o que aumenta a confiabilidade dos resultados (OSTROSKY et al., 2008).

A técnica da microdiluição em caldo foi avaliada em diversos estudos e seus resultados foram classificados como: CIM menor que 100 µg/mL = boa atividade antibacteriana; CIM entre 100-500 µg/mL = atividade moderada; de

500-1000 µg/mL como fraca atividade e acima de 1000 µg/mL considerada inativa (HOLETZ et al. 2002; AYRES et al., 2008; SANTOS et al., 2007).

Com base na classificação acima descrita, foi possível observar que a maioria das amostras promoveram a inibição aos microrganismos testados em concentrações acima de 2000 µg/mL. No entanto, o extrato bruto e a fração acetato de etila apresentaram inibição na concentração de 1000 µg/mL contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente.

Um grande número de estudos sobre a avaliação antimicrobiana de espécies do gênero *Baccharis* foram realizados (ABAD; BERMEJO, 2007; CAMPOS et al., 2016). No estudo realizado por Oliveira et al. (2005) a fração butanólica de *B. spicata* (Lam.) Baill. na concentração de 1000 µg/mL foi eficaz contra *S. aureus*.

O OE de *B. erioclada* contém constituintes que poderiam ser considerados com bom potencial antimicrobiano. O OE apresentou valores de CIM = 1000 µg/mL para *E. coli* e CIM = 1000 µg /mL para *C. albicans*. Valores de CIM superiores a 2000 µg/mL foram observados para *P. aeruginosa* e *S. aureus*. No estudo de Kurdelas et al. (2012) com o OE de *B. darwinii* observaram valores de CIM de 1000 µg/mL para *E. coli*, *Yersinia enterocolítica* e *Salmonella enteritidis*.

Ferronato et al. (2007) verificaram que o OE de *B. uncinellae* *B. dracunculifolia* demonstraram atividade inibitória contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Zapata et al. (2010) observaram que o OE de *B. latifolia* era ativo contra *Aspergillus fumigatus* com CIM de 157,4 mg / ml. No estudo de Parreira et al. (2010), verificou-se que o OE de *B. dracunculifolia* não apresentou atividade sobre leveduras pertencentes ao gênero *Candida*.

5.5.3 Ensaio antioxidantes

Devido à complexidade da composição química dos extratos e frações oriundos de plantas medicinais, sugere-se a utilização de mais de um método na avaliação do potencial antioxidante de extrato de plantas (CHOI et al., 2002; GARG et al., 2012). Diante do exposto, a TABELA 14 apresenta os valores obtidos para todos os ensaios antioxidantes realizados.

TABELA 14 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE *B. erioclada* POR DIFERENTES MÉTODOS.

Amostra	DPPH (IC ₅₀ - µg/ml)	Poder de redução (%) (em relação a vitamina C)	TBARS (%) (em relação ao BHT)	Capacidade antioxidante total (%)
EB	127,00 ± 0,165	61,71 ± 0,013	56,07 ± 0,180	51,13 ± 3,408
FH	276,00 ± 0,874	48,27 ± 0,014	28,97 ± 0,019	24,96 ± 1,162
FCL	301,80 ± 0,546	53,41 ± 0,026	29,44 ± 0,050	15,03 ± 0,916
FAE	247,87 ± 0,472	57,42 ± 0,003	17,85 ± 0,085	23,47 ± 0,191
FM	276,98 ± 0,367	58,67 ± 0,005	31,24 ± 0,062	21,18 ± 0,478
BHT	-	-	50,55 ± 0,009	-
Rutina	-	-	-	36,15 ± 1,217
Vitamina C	6 ± 0,002	-	-	100 ± 0,184
OE	-	-	20,26 ± 0,141	49,02 ± 1,313
BHT	-	88,57 ± 0,002	56,07 ± 0,173	
Rutina	-	107,01 ± 0,03	-	
Vitamina C	-	90,03 ± 0,08	-	

FONTE: a autora (2018)

NOTA: (EB) Extrato Bruto, (FH) Fração Hexano, (FC) Fração Clorofórmio, (FAE) Fração Acetato de Etila, (FM) Fração Metanólica, (OE) Óleo essencial.

Com base nos resultados obtidos nos diferentes métodos é possível determinar que o extrato bruto apresentou maior capacidade antioxidante, visto que apresenta baixos valores de IC₅₀ e maiores porcentagens de redução em relação às frações. Destaca-se, ainda, que nos ensaios de TBARS e capacidade antioxidante total os valores obtidos para o extrato bruto foram superiores aos obtidos para o controle positivo. De forma geral a melhor resposta obtida para o extrato bruto pode ser justificada pela ação do sinergismo entre os seus compostos.

O ensaio de redução de DPPH determina, por colorimetria, a concentração de substâncias capazes de doar elétrons a fim de estabilizar o radical. É descrito como um método fácil, preciso e reprodutivo na determinação da atividade antioxidante de extratos vegetais e substâncias puras (COTINGUABA et al., 2013). Podendo ser empregado para screening de produtos naturais, tornando-se um importante teste preliminar para a determinação do potencial antioxidante de um extrato, fração ou substância

pura. Diversas substâncias químicas têm apresentado estreita correlação entre as atividades sequestradora de DPPH e antioxidante determinada em modelos biológicos e outros não biológicos (YAMAZAKI et al., 1994). Resultados positivos estão associados à presença de compostos fenólicos na matriz vegetal (VON GADOW; JOUBERT; HANSMANN, 1997; YOKOZAWA et al., 1998).

Inúmeros trabalhos a respeito das atividades antioxidantes de *Baccharis* foram realizados (ABAD; BERMEJO, 2007; CAMPOS et al., 2016). Entretanto, poucos estudos sobre a atividade antioxidante do OE de espécies de *Baccharis* são relatados, quando comparados aos testes realizados com extratos e frações, o que reforça a necessidade de realizar essas investigações.

Tapia et al. (2004) verificaram que os extratos aquosos de *Baccharis grisebachii* Hieron., inibiram a formação de radicais livres em diferentes sistemas *in vitro* em concentrações de 50-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Dias et al. (2009) verificaram a atividade antioxidante de *B. crispa*, em preparações da droga pulverizada, extrato bruto liofilizado, extrato bruto liofilizado da "resina" e frações clorofômica, acetato de etila, etanol absoluto e etanol 50%, cujos dados apresentaram EC_{50} que variou de 22,74 a 18,19 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em um estudo anterior, Simões-Pires et al. (2005) observaram significativa atividade antioxidante dos extratos aquosos de *B. crispa* e *B. usterii* Heering frente ao DPPH, sugerindo tal ação à presença de ácidos cafeoilquímicos.

No estudo realizado por Akaike et al. (2003) foram avaliados os compostos isolados de *B. gaudichaudiana* frente ao DPPH como Quercetina-3-O-rhamnosideo, eupafolina, rutina e ácido 3,5-dicaffeoylquinic, os quais mostraram moderada atividade quando comparados ao padrões Trolox (1,0 mM) ou a quercitina (1,9 mM). Extratos das folhas de *B. dracunculifolia* apresentaram significativa atividade antioxidante com CI_{50} de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (FABRI et al., 2011). Esses resultados confirmaram a atividade antioxidante previamente relatada para os extratos de *B. dracunculifolia* (ABAD; BEMEJO, 2007).

O teste do poder redutor baseia-se na redução do íon ferricianeto a ferricianato que, na presença do íon férrico (proveniente do FeCl_3), forma o azul da Prússia. Destacam-se os valores de poder redutor apresentados pelo

EB e OE de 51,13% e 90,03% respectivamente quando comparados à vitamina C. Não foram encontrados ensaios na literatura com outras espécies de *Baccharis* utilizando esta técnica, entretanto, os resultados da avaliação do poder redutor de *Calendula officinalis* L, pertencente à família Asteraceae, indicaram baixa capacidade redutora dos extratos etanólicos variando de 4,38 a 9,06% (SANTOS et al., 2015).

Outro método empregado foi o TBARS, o qual utiliza substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Este método avalia a proteção da lipoperoxidação promovida por substâncias antioxidantes presentes nas matrizes vegetais com o auxílio de uma fonte rica em lipídios (ROGINSKY; LISSI, 2005). Metabólitos secundários como flavonoides, cumarinas, fenilpropanoides e terpenoides foram relatados como inibidores da peroxidação lipídica (OLIVEIRA, 2004).

A amostra do óleo essencial de *B. erioclada* apresentou 20,26% de inibição, valor inferior ao BHT (56,07%). No teste realizado para o óleo essencial de *B. milleflora*, verificou-se que a amostra do inverno apresentou atividade antioxidante de 29,06%. Esta atividade foi superior à obtida com o antioxidante padrão da BHT (26,42%). O OE do outono apresentou um índice de atividade antioxidante próximo ao BHT (25,91%) (PEREIRA et al., 2016). Entretanto o EB de *B. erioclada* apresentou 56,07% sendo esse valor superior ao padrão BHT.

Mongelli et al. (1997) verificaram a atividade antioxidante do extrato aquoso obtido das partes aéreas de *B. coridifolia* frente ao ensaio de determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), cujo IC₅₀ foi igual a 556 µg/mL. Estudando outra espécie, Tapia e colaboradores (2004) observaram o efeito antioxidativo dos extratos de *B. grisebachii*, atividade conferida aos compostos fenólicos isolados. Ambos estudos sugeriram que a presença destes metabólitos secundários poderiam justificar o uso popular destas espécies no tratamento de distúrbios gástricos. OH e colaboradores (2001) relataram que a formação de espécies reativas ao oxigênio (ERO), como o ânion superóxido e radicais hidroxila, seriam capazes de causar efeitos deletérios na membrana celular e tecidos, sendo que muitos problemas gastrintestinais estariam envolvidos com estresse oxidativo.

Estudos realizados por Oliveira (2004) demonstraram que extratos brutos (etanólico e aquoso) e frações (acetato de etila, n-butanol e resíduo aquoso) de *B. crisper*, *B.usterii* (syn. *B. junciformis* DC.) e *B. spicata* apresentaram atividade antioxidante, uma vez que inibiram a peroxidação lipídica diminuindo a produção de MDA reagente do TBA. O estudo também mostrou que as frações mais polares possuem maior atividade antioxidante. A fração mais ativa, no caso de *B. spicata* e *B. trimera* foi a n-butanol, no caso de *B. usterii* tanto a fração aquosa quanto a n-butanol apresentaram atividade similar.

Vieira et al. (2011), comparou as propriedades antioxidantes de extratos aquoso e etanólico obtidos de *Baccharis articulata*, *B.crispa*, *B. spicata* e *B.usterii* por diversas técnicas que abrangem uma gama de espécies oxidantes entre elas: capacidade dos extratos vegetais para eliminar o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil), ação contra peroxidação lipídica de membranas incluindo microssomas de fígado de rato e lipossomas de fosfatidilcolina de soja por radical ascorbila e peroxinitrito. Os extratos aquosos mostraram-se mais eficientes que os extratos etanólicos com relação à peroxidação lipídica dos microssomas induzida pelo radical ascorbil. Entretanto, foram observadas diferenças significativas apenas entre as ações dos extratos de *B. articulata* e *B. trimera* na proteção dos lipossomas contra danos induzidos pelo radical ascorbil. No trabalho de Mendes et al. (2007), o resultado do EC₅₀ de *B. trimera* foi 7,76 µg/mL e o modelo por eles utilizado foi de lipoperoxidação em cérebro de rato.

A capacidade antioxidante total é dada por substâncias hidrofílicas e lipofílicas presentes nos extratos e frações e pode ser avaliada pelo método da redução do complexo fosfomolibdênio, que se baseia na determinação espectrofotométrica da redução do Molibdênio VI a Molibdênio V com formação do fosfato de Mo⁺⁵ (PRIETO et al., 1999). Os resultados obtidos indicam que as amostras ao reduzirem o molibdênio VI a molibdênio V podem inibir a ação da xantina oxidase, uma vez que o molibdênio é utilizado como cofator desta enzima (COUGHLAN et al., 1969). Essa enzima é responsável pela produção de radicais superóxido durante a conversão da xantina e da hipoxantina em ácido úrico.

O OE de *B. erioclada* apresentou atividade antioxidante de 49,02%, sendo superior à rutina, utilizada como padrão. Pereira et al. (2017) avaliaram amostras de OE de *B. milleflora* nas diferentes estações do ano em relação ao método do fosfomolibidênio e verificaram que as amostras apresentaram atividade antioxidante significativa quando coletadas no outono (79,81%) e no inverno (79,1%).

No ensaio da inibição da xantina oxidase realizado por Borgo (2010), verificou-se potencial atividade antioxidante *in vitro* de três extratos obtidos por diferentes métodos de secagem, em que a concentração de 100 µg/mL reduziu em cerca de 80% a produção de DHBA (ácido diidróxibenzóico) em comparação ao controle negativo. Sugere-se que este efeito observado nos extratos possa ser devido a presença do flavonoide quercetina e/ou à ação sinérgica de outros compostos fenólicos.

Com base na análise dos diferentes mecanismos de reação, pode-se verificar que o EB, frações e OE de *B. erioclada* apresentaram atividades antioxidantes nas concentrações testadas. Como as amostras são misturas complexas, a capacidade antioxidante pode ser devida à presença de compostos antioxidantes ou ao sinergismo entre estes compostos. Os compostos antioxidantes têm efeitos benéficos como a sua capacidade de prevenir danos oxidativos, impedindo assim a progressão de várias doenças.

5.6 Doseamento de fenólicos e flavonoides totais

Foi realizada a quantificação de compostos fenólicos e flavonoides totais no EB. Os valores determinados são apresentados na TABELA 15.

TABELA 15 - QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS NO EXTRATO BRUTO DE *B. erioclada* (mg/g)

Amostra	Compostos fenolicos totais	Flavonoides totais
EB	160,663	47,987

FONTE: a autora (2018).

NOTA: EB = extrato bruto.

Foram encontrados excelentes resultados em relação à concentração de polifenóis totais e flavonoides totais para o EB da espécie em estudo.

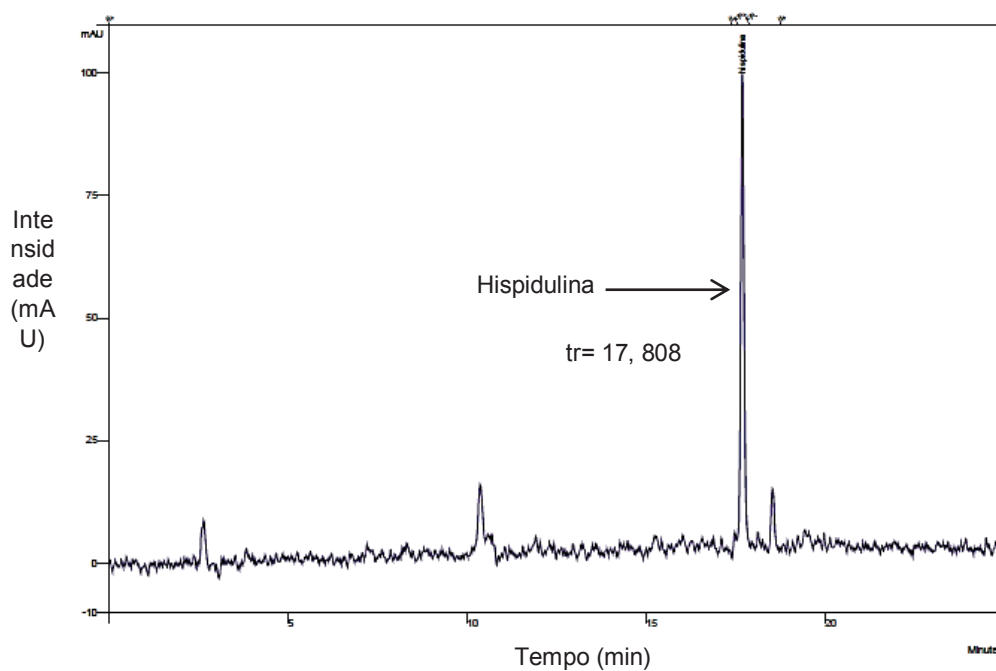
De acordo com CHEW et al. (2011) concentrações de fenóis acima de 50 mg.EAG.g⁻¹ é considerado alta e de 30-50 mg.EAG.g⁻¹ média-alta. Segundo esta classificação, pode-se dizer que o EB apresentou alta concentração de fenóis. Os compostos secundários que possuem atividade positiva na análise de Folin Ciocalteu são: ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, fenóis simples, ligninas, lignanas, taninos hidrolisáveis e condensados (BLAINSKI et al., 2013).

Segundo Verdi, Brighente e Pizzolatti (2004) a presença de polifenóis e flavonoides é comum no gênero *Baccharis*. Portanto, os resultados obtidos para o extrato bruto das partes aéreas corroboram com os dados descritos na literatura para outras espécies do gênero. De acordo com Souza, Campos, Packer (2013) sabe-se que muitos compostos presentes em algumas espécies de plantas apresentam atividade antioxidante e fotoprotetora, podendo intensificar a proteção final promovida pelo produto ou neutralizar os radicais livres produzidos na pele após exposição solar.

Os flavonoides neutralizam, por natureza, espécies químicas reativas de oxigênio, as quais promovem a degeneração celular. Por este motivo, os estudos fitoquímicos de extratos naturais são de grande importância, pois, verifica-se que uma das tendências do mercado farmacêutico é o desenvolvimento de produtos com ativos naturais para a prevenção do envelhecimento cutâneo (ROSA et al., 2008; VIOLANTE et al., 2009).

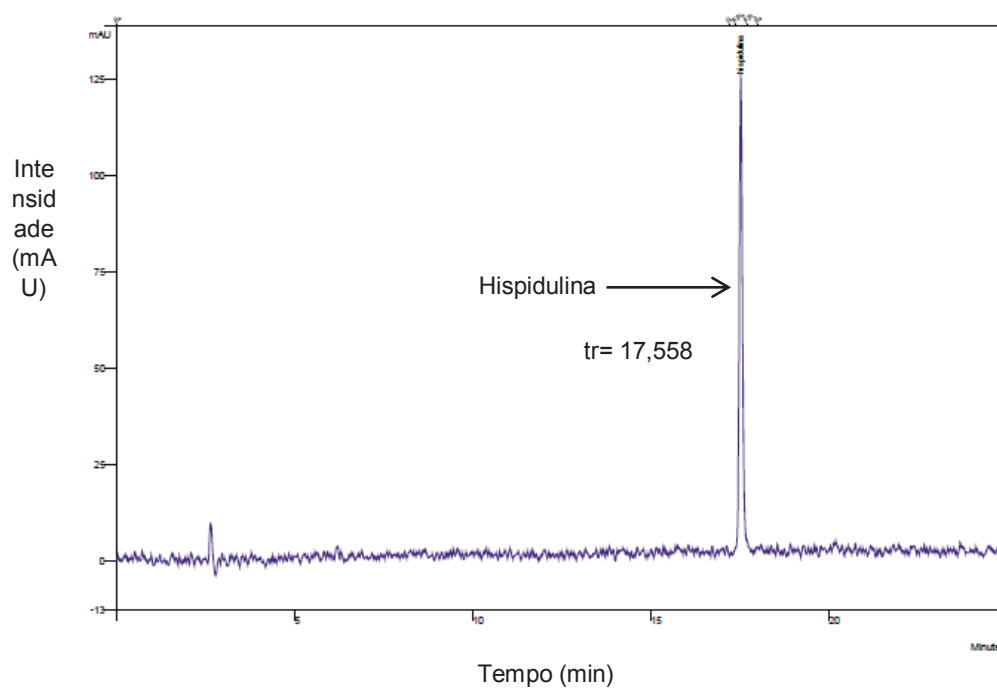
5.7 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Com o intuito de analisar e sugerir possíveis moléculas presentes no EB, uma vez que ele apresentou os melhores resultados no estudo de capacidade antioxidante, realizou-se uma avaliação qualitativa empregando a técnica de cromatografia líquida de alta-eficiência (CLAE). O desenvolvimento do método cromatográfico foi baseado no trabalho desenvolvido por Carvalho (2008) e Hayashi (2012). O perfil cromatográfico do extrato bruto foi analisado em 289 nm. O cromatograma do EB é apresentado na FIGURA 12 e o do padrão de hispidulina é apresentado na FIGURA 13. O espectro UV é mostrado na figura 14.

FIGURA 12: CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO OBTIDO DE *B. erioclada*.

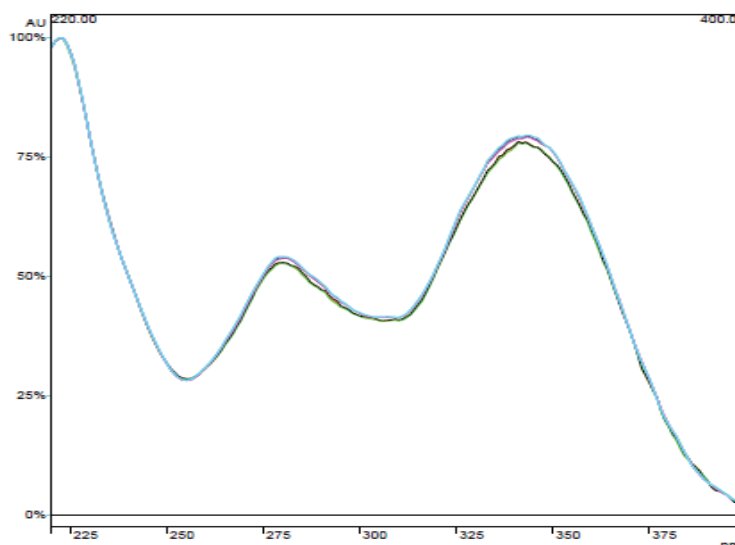
FONTE: a autora (2018).

FIGURA 13: CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE HISPIDULINA



FONTE: a autora (2018).

FIGURA 14: ESPECTRO UV DO PADRÃO DE HISPIDULINA E DO EB.



FONTE: a autora (2018).

Através da análise do cromatograma é possível verificar a presença de picos cromatográficos com diferentes tempos de retenção, portanto a presença de substâncias com diferentes graus de polaridade. A maior área foi obtida no tempo de retenção de 17 minutos.

O espectro de UV apresenta perfil característico de flavonoide, possuindo bandas de absorção máximas relacionadas com os anéis B e C, em 300 a 380 nm (banda I). Os espectros da classe dos flavonoides variam conforme oxigenação do composto, provocando desvios das bandas de absorção (MABRY et al., 1970).

A CLAE tornou-se uma ferramenta analítica dominante para a separação e determinação de polifenóis com diferentes sistemas de detecção, como o detector de arranjo de diodos (DAD). Tal detector é o mais utilizado nas pesquisas acerca de flavonoides em que se usa CLAE como técnica analítica, visto que permite a varredura, em tempo real, de todo o espectro UV/VIS, fornecendo maiores informações a cerca de misturas complexas, tais como extratos vegetais brutos (HUBER, RODRIGUEZ-AMAYA, 2008; DAI, MUMPER, 2010; IGNAT; VOLF; POPA, 2011).

Khoddami, Wilkes e Roberts (2013) em um artigo de revisão sobre técnicas para análise de compostos fenólicos derivados de plantas coloca a metodologia de CLAE como a primeira escolha para separação e quantificação

desses compostos. Nesse trabalho, são descritas ainda, as condições necessárias para pesquisa de diversas espécies vegetais, classes de compostos e derivado vegetal, citando mais de 30 amostras distintas.

5.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE

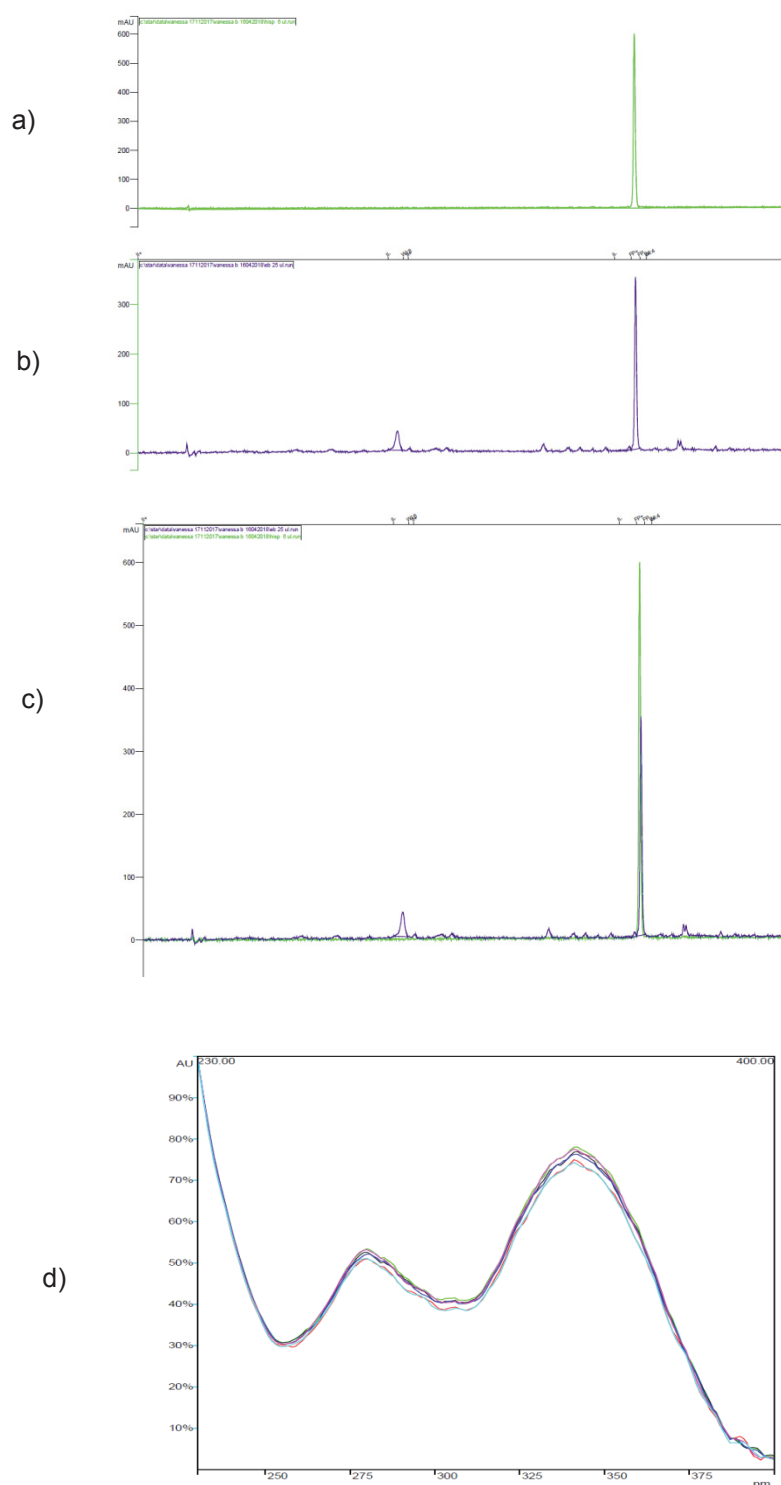
Para a preparação de produtos à base de plantas medicinais torna-se de extrema importância utilizar extratos padronizados garantindo produtos finais com adequados requisitos de qualidade. Dessa forma diversas técnicas analíticas podem ser empregadas com o intuito de quantificar os principais constituintes presentes nessas preparações, dentre elas, têm-se a CLAE, uma das técnicas mais amplamente utilizada em análises de rotina (GÖKBULUT, 2016).

A curva de calibração construída com diferentes concentrações de hispidulina apresentou elevado valor de coeficiente de determinação, sendo $R^2 = 0,9944$. Correlacionando o valor de área do pico cromatográfico da hispidulina presente na amostra de extrato bruto, tempo de retenção de 17,5 min, com a equação da reta obtida na curva de calibração ($y = 205878x + 488056$) foi possível determinar o teor desse flavonoide nas amostras de EB, obtendo-se valor de 27,22 µg/mL de hispidulina presente no extrato seco de *B. erioclada*.

5.8.1 Seletividade

A seletividade foi estabelecida através da pureza do pico. Para a determinação da pureza, um detector de arranjo diodos (DAD) com intervalo de 230 a 400 nm foi utilizado. Conforme o software *Purity Parameter Statistics*. Os cromatogramas referentes à pureza dos picos são apresentados na FIGURA 15.

FIGURA 15 - CROMATOGRAMAS E ESPECTRO DE UV REPRESENTANDO A PUREZA DOS PICOS PARA O ENSAIO DE SELETIVIDADE



FONTE: a autora (2018).

NOTA: a - cromatograma do padrão hispidulina. b - cromatograma do extrato bruto. c- interposição dos picos. d- Espectro de UV.

O pico puro ideal é aquele que possui um fator de pureza de 1,0. Valores inferiores a 0,990 indica um grau de incerteza ou impureza provável (MELO; VIEIRA; NOGUEIRA, 2013). A similaridade entre o padrão hispidulina (com tempo de retenção: 17,558 min) e o extrato bruto (tempo de retenção de 17,808 min) foi de 0,999925.

5.8.2 Linearidade e faixa de trabalho

A linearidade foi determinada em cinco níveis de concentração, contemplando as faixas de 21 a 49 µg/mL em triplicata, conforme a TABELA 16. As curvas de calibração foram feitas com o auxílio do software *Excel*. Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear, a partir da qual obteve-se a equação da reta e coeficiente de determinação (FIGURA 16). Com os resultados das áreas do pico cromatográfico, foi determinado o coeficiente de correlação (r) acima de 0,99, estando este de acordo com as resoluções. A equação linear obtida para o método foi $y = 205878x + 488056$.

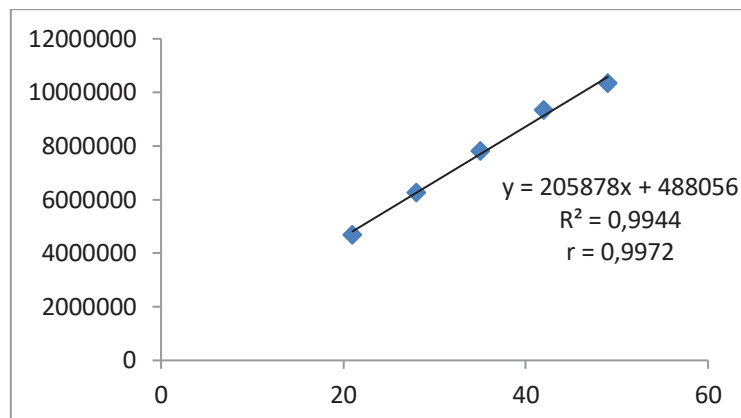
TABELA 16 - RESULTADOS DO ENSAIO DE LINEARIDADE

%	[] teórica	A	[] exp.	DP	CV	Erro	Exatidão (%)
60	21	4690844,667	20,41	1,0042	4,9194	-0,59	97,21
80	28	6262235,667	28,04	1,2210	4,3537	-0,04	100,17
100	35	7820497,667	35,61	1,2737	3,5762	-0,61	101,76
110	42	9335387,667	42,97	1,5450	3,5954	-0,97	102,32
120	49	10360007,33	47,95	1,9242	4,0130	-1,05	97,86

FONTE: a autora (2018).

NOTA: % = Porcentagem, [] teórica = concentração teórica, A= área, [] exp.= concentração experimental, DP= desvio padrão, CV= coeficiente de variação.

FIGURA 16 – GRÁFICO DA LINEARIDADE DO PADRÃO HISPIDULINA



FONTE: a autora (2018).

Conforme descrito no *Analytical Methods Committee* (AMC), um valor de coeficiente de correlação próximo a 1 não é necessariamente o resultado de relação linear, e por isso, deve ser aplicado o teste de falta de ajuste (*lack of fit*). Este teste avalia a variação dos valores residuais (GOMES et al., 2015; HADAD; EMARA; MAHMOUD, 2009). O teste ANOVA para a linearidade está apresentado na TABELA 17. Para falta de ajuste, o valor de F foi menor que o valor de F tabelado, para o intervalo de 95% de confiança ($\alpha = 0,05$), portanto, a regressão linear não apresentou falta de ajuste (KLEIN; LONGHINI; DE MELLO, 2012).

TABELA 17 - RESULTADOS DE ANOVA PARA LINEARIDADE DO MÉTODO

	SS	DF	MS	F	F _{tab}
Modelo	6.230720E+13	1	6.230720E+13	610.6402	3.136
Resíduo	1.326466E+12	13	1.020359E+11	Linear	
Falta de ajuste	3.527196E+11	3	1.175732E+11	1.207431	2.728
Erro puro	9.737466E+11	10	9.737466E+10	Não há falta de ajuste	

FONTE: a autora (2018).

NOTA: SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: média dos quadrados, F: valor F do teste; F_{tab}: valor do F tabelado.

A menor concentração onde a hispidulina pode ser detectada (LD) e quantificada (LQ) com aceitável precisão e exatidão foi 0,094445 e 0,286197 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A TABELA 18 resume os parâmetros da curva.

TABELA 18 - RESUMO DOS PARÂMETROS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA HISPIDULINA

LINEARIDADE	
Faixa linear	21 - 49 µg/mL
Limite de detecção	0,094445 µg/mL
Limite de quantificação	0,2862 µg/mL
Dados de regressão	
N	3
Inclinação (α)	205878
Desvio padrão da inclinação	5892,18511
Desvio padrão relativo da inclinação (%)	2,8619744
Intercepto (b)	488056
Coefficiente de correlação (r)	0,9972

FONTE: a autora (2018).

5.8.3 Efeito matriz

Os resultados das áreas dos picos cromatográficos obtidos para análise de efeito matriz estão dispostos na (TABELA 19).

TABELA 19 - ÁREAS DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS DA AMOSTRA OBTIDAS A PARTIR DAS ANÁLISES DO PADRÃO E AMOSTRA COM ADIÇÃO DE PADRÃO

Concentração	Área sem fortificação	Área com fortificação
21	1455899	3712755
28	3365054	5504533
35	4933766	7284776
42	5936816	8234888
49	7730903	10470844

FONTE: a autora (2018).

Neste sentido, o coeficiente angular da curva sem fortificação obtido foi de 216025 e o coeficiente angular da curva com fortificação igual a 232093. Portanto, foi possível observar que os testes de comparação de curvas possuem p-valor maior que 0,05, não apresentando diferença significativa entre as curvas, com e sem matriz, ao nível de significância de 5%, sendo assim, o efeito matriz não é significativo.

5.8.4 Precisão

A precisão de um método analítico é avaliada pela proximidade das medidas individuais de uma substância quando o procedimento é aplicado repetidamente para múltiplas alíquotas (ICH, 2005). A repetibilidade mostra a precisão sob as mesmas condições de operação durante um curto intervalo de

tempo. A repetibilidade e a precisão intermediária estão representadas na TABELA 20, respectivamente.

O teste *t*-student avalia a existência de qualquer diferença entre os diferentes níveis de um fator. Até 5 % considera-se que o método é preciso.

TABELA 20 - DADOS DA REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

	Repetibilidade (intra-dia)	Precisão intermediária (interdia)
Média	8086041,17	7927638
DRP	3,42829153	3,11073138

FONTE: a autora (2018).

NOTA: DPR = desvio padrão relativo.

5.8.5 Exatidão

A exatidão do método por ensaios de recuperação foi determinada pela adição de quantidade exata de hispidulina a uma solução de concentração conhecida do extrato bruto.

Na TABELA 21, é possível observar que foram obtidos valores satisfatórios de exatidão para a amostra. Portanto, estes resultados indicam que o método proposto é considerado exato.

TABELA 21 - RESULTADOS DO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO OBTIDOS PELO MÉTODO DE ADIÇÃO DE PADRÃO

%	[] Teórica µg/mL	[] Experimental	Área	% Recup.	DP	CV
80	28	27,02	6088427	97,1513	1,8005	1,8532
100	35	34,84	7688927	99,5340	0,6016	0,6045
120	42	41,72	9078009	99,3416	1,6792	1,69040

Fonte: a autora (2018).

NOTA: % = nível; [] Teórica = concentração teórica; [] Experimental = concentração média experimental; A= área; % Recup = porcentagem de recuperação; DP = desvio padrão, CV: coeficiente de variação.

5.8.6 Robustez

De acordo com a ICH (2005), um método analítico é considerado robusto quando apresenta a capacidade de permanecer-se inalterado,

mediantes a pequenas variações dos parâmetros do método, garantindo uma indicação da sua confiabilidade em condições normais de uso.

O ensaio de robustez do método apresentou valores de $p > 0,05$ para todos os parâmetros modificados, demonstrando, assim, que os resultados não foram considerados estatisticamente diferentes, ou seja, estas pequenas modificações não provocaram alteração na exatidão dos resultados. Os resultados obtidos estão descritos na TABELA 22.

TABELA 22 - RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ

Parâmetro modificado	Condição	[] Experimental	CV
Fluxo	0,9	35,44	3,90
	1,1	36,01	3,35
Fase móvel	69/28/3	36,23	1,95
	71/26/3	36,62	1,58
Injeção	0,9 μ L	33,50	1,02
	1,1 μ L	38,05	0,87

Fonte: a autora (2018).

NOTA: DP = desvio padrão, CV: coeficiente de variação.

5.9 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE AMIDO

Os filmes ficaram flexíveis, transparentes nas formulações inertes e levemente esverdeados nas formulações com extrato bruto incorporado. Todas as formulações apresentaram superfícies lisas, o que sugere homogeneidade na mistura dos componentes.

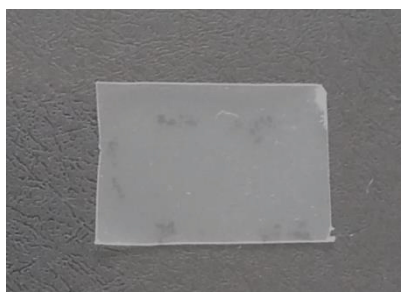
5.9.1 Análise subjetiva

Durante o processo de produção dos filmes podem ocorrer certos problemas que influenciam o desempenho final do produto. A análise subjetiva favorece a detecção de pontos relacionados com a aparência e a formação do filme polimérico que podem influenciar o seu desempenho mecânico (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

De acordo com as características de avaliação subjetiva estabelecidas por Gontard (1991), foram verificados os seguintes parâmetros nos filmes obtidos: continuidade (ausência de rupturas ou fraturas após a secagem), homogeneidade (ausência de partículas insolúveis ou bolhas visíveis a olho nu, zonas de opacidade ou cores diferenciadas) e manuseabilidade (facilidade em ser manuseado sem risco de ruptura).

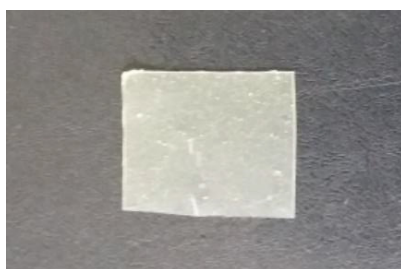
Neste sentido, todas as formulações apresentaram excelentes resultados frente aos parâmetros avaliados. Não houve diferença nos resultados dos filmes inertes daqueles contendo extrato (FIGURA 17 e 18).

FIGURA 17 – ASPECTO DO FILME INERTE



FONTE: a autora (2018).

FIGURA 18 – ASPECTO DO FILME CONTENDO EXTRATO



FONTE: a autora (2018).

Os excelentes resultados se devem principalmente a utilização do glicerol como agente plastificante, pois ele permite redução das pontes de hidrogênio entre as cadeias dos polímeros e interfere no espaço molecular, favorecendo dessa forma a flexibilidade dos filmes.

No desenvolvimento de blendas poliméricas de amido com quitosana Cervera et al. (2004) verificaram que os filmes desenvolvidos com glicerol apresentaram melhor continuidade do que os outros plastificantes utilizados na mesma concentração. Dias (2008), analisou filmes de amido com 20 e 30% de glicerol, em relação a concentração de amido da formulação e constatou que quantidades maiores de plastificante melhoraram as características de manuseabilidade e continuidade dos filmes.

Com relação à estabilidade, foi observado que a partir de 90 dias ocorreu liberação de glicerol nas formulações que não se encontravam em dessecador. Segundo Mali, Grossmann, Yamashita (2010), a estocagem é um fator importante para a conservação dos filmes de amido, pois devido a sua natureza hidrofílica é um material muito mais susceptível a alterações de umidade e temperatura.

5.9.2 Espessura

Os valores de espessura dos filmes estão apresentados na TABELA 23.

TABELA 23 - ESPESSURA DOS FILMES DE AMIDO DE MILHO INERTES E COM EXTRATO BRUTO DE *B. erioclada* DC.

Formulação	Espessura (mm)
F1 I	0,21 ± 0,012
F2 I	0,24 ± 0,008
F3 I	0,33 ± 0,010
F4 I	0,32 ± 0,121
F1 3%	0,20 ± 0,016
F2 3%	0,31 ± 0,011
F3 3%	0,25 ± 0,008
F4 3%	0,26 ± 0,013

FONTE: a autora (2018).

NOTA: F1 I = Formulação 1 inerte; F2 I = Formulação 2 inerte; F3 I = Formulação 3 inerte; F4 I = Formulação 4 inerte; F1 3% = Formulação 1 com extrato a 3%; F2 3% = Formulação 2 com extrato a 3%; F3 3% = Formulação 3 com extrato a 3%; F4 3% = Formulação 4 com extrato a 3%;

A técnica de *casting* utilizada no desenvolvimento dos filmes permitiu um controle satisfatório da espessura dos filmes, uma vez que não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$). Os filmes deste trabalho apresentaram espessura maior quando comparados com a dos filmes de amido elaborados por Isotton (2013) e com as espessuras dos filmes de amido de mandioca plastificado com glicerol ou sorbitol (HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO; 2008; MULLER; LAURINDO; YAMASHITA, 2008; ARAÚJO, 2014).

Fakhouri et al.(2012) desenvolveram filmes de amido de mandioca e gelatina e obtiveram valores entre 340 a 750 μm . Já Souza e colaboradores (2012) observaram espessuras bem superiores, variando de 1230 a 1410 μm para filmes de fécula de mandioca com adição de polpa de manga e acerola.

Estudos demonstram que a espessura dos filmes aumenta com o aumento da concentração amido, ou aumento de teor de sólidos totais (ZAVAREZE et al., 2012; SOUZA et al., 2012). Além disso, os filmes na presença de glicerol apresentam maior espessura, devido ao seu caráter altamente hidrofílico (ISOTTON, 2013).

Outro fator a ser observado é com relação ao espalhamento das soluções filmogênicas viscosas sobre a placa durante o processo de produção tipo *casting*. Essa é uma etapa que exige atenção, no entanto ainda é, um parâmetro pouco estudado (SOBRAL, 2000; MALI; GROSSMANN, YAMASHITA, 2010),

5.9.3 Microscopia eletrônica de varredura

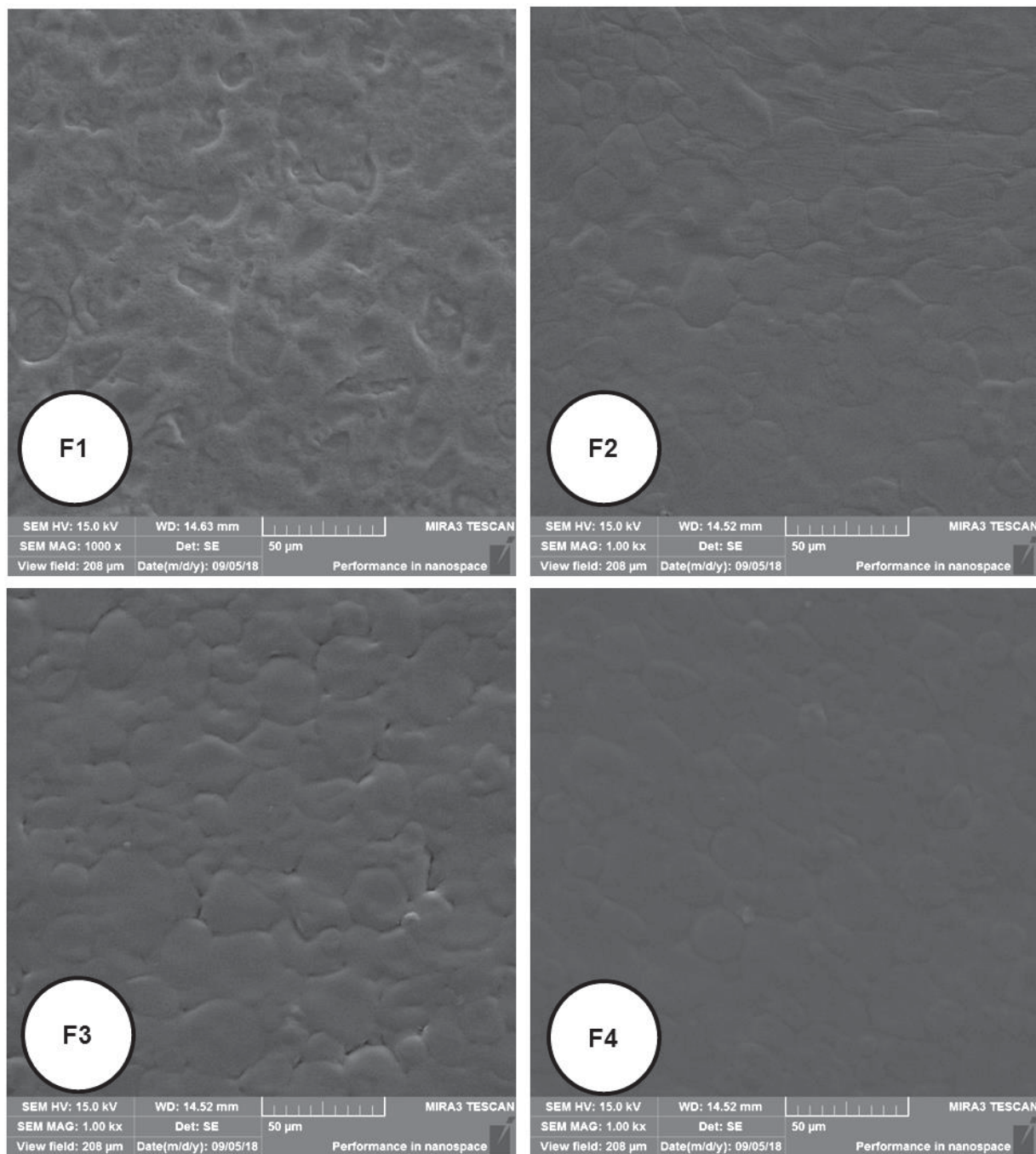
Análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas nas superfícies e nas secções transversais dos filmes de amido com e sem extrato. As superfícies variaram de lisas a rugosas, não porosas e compactas (FIGURAS 19 a 22).

Como os filmes com glicerina são sensíveis a esta análise e deterioram-se com o uso de uma tensão superior a 10kV, não foi possível fazer imagens com grandes aumentos e consequentemente verificar neles a presença de poros.

No trabalho realizado por Isotton (2013) os filmes obtidos com plastificantes como glicerol e sorbitol apresentam superfícies lisas e compactas. Esta descrição vai ao encontro das características observadas para este trabalho.

Em secção transversal, os filmes mostraram-se densos e regulares, o que sugere uma estrutura homogênea. Essa descrição vai ao encontro do relatado por Araújo (2014). Não houve diferença na avaliação morfológica das formulações inertes das contendo extrato.

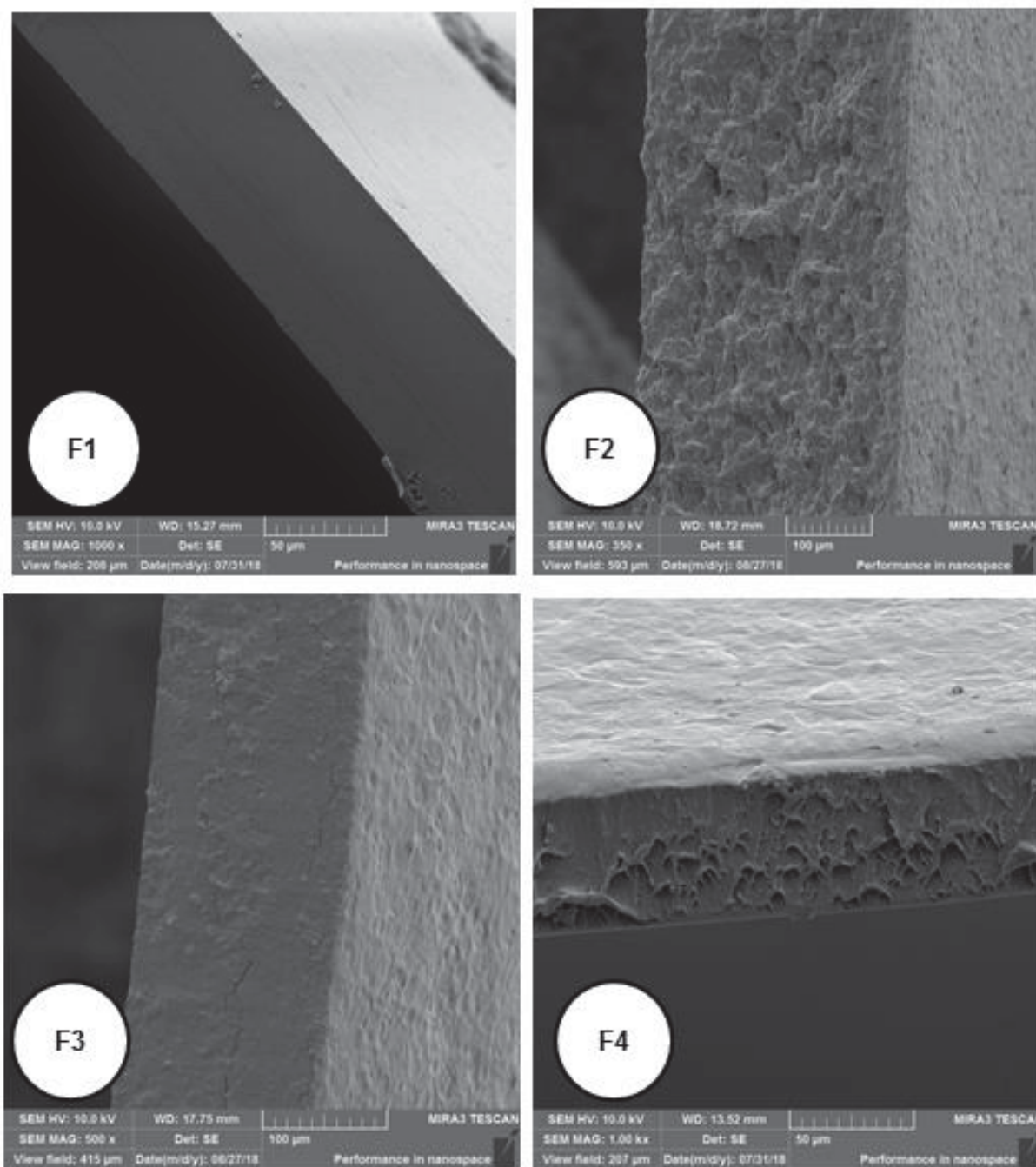
FIGURA 19 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR EMISSÃO DE CAMPO DA SUPERFÍCIE DOS FILMES INERTES



FONTE: a autora (2018).

NOTA: F1 I = Formulação 1 inerte; F2 I = Formulação 2 inerte; F3 I = Formulação 3 inerte; F4 I = Formulação 4 inerte.

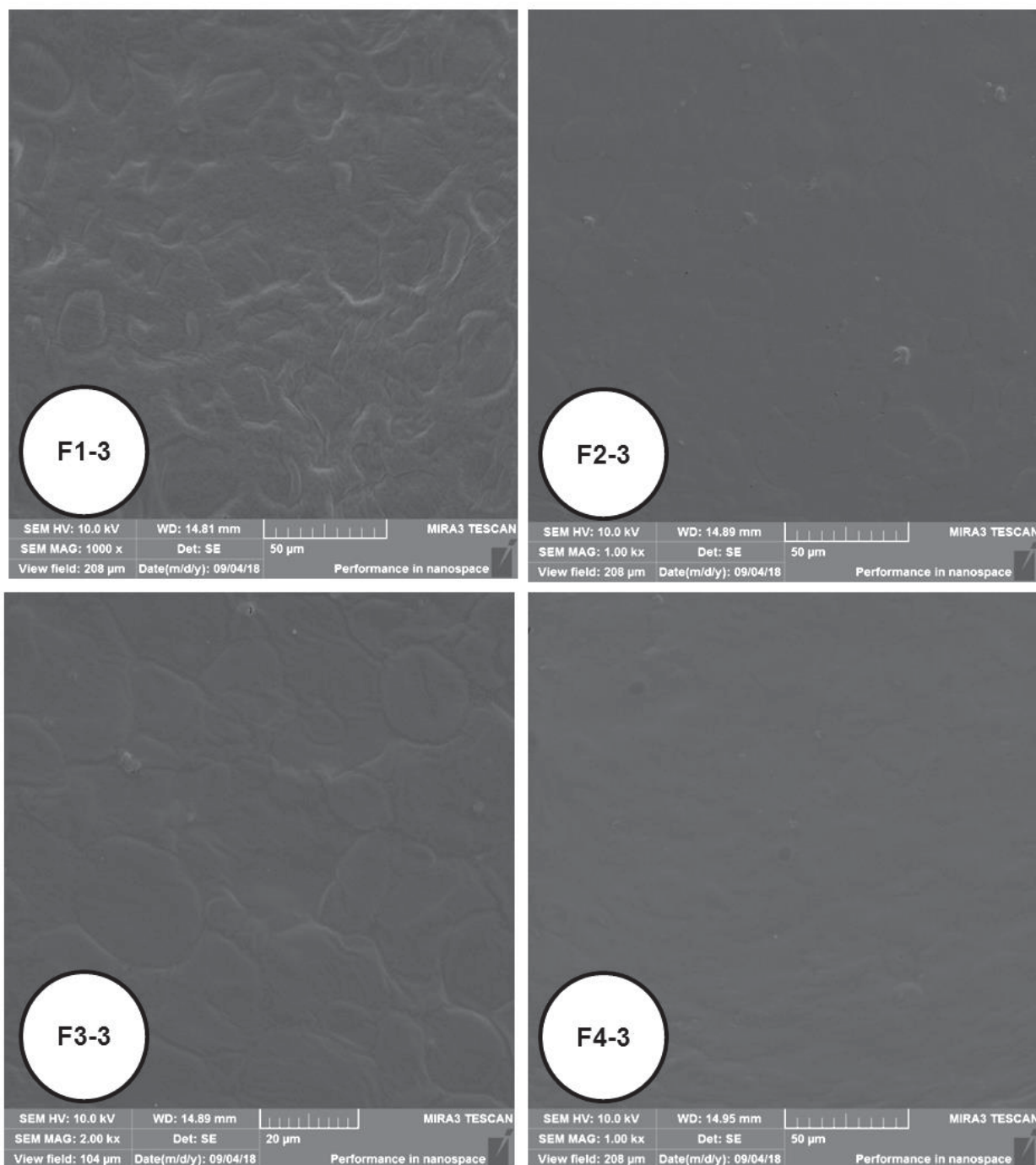
FIGURA 20 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR EMISSÃO DE CAMPO DA FRATURA DOS FILMES INERTES



FONTE: a autora (2018).

NOTA: F1 I = Formulação 1 inerte; F2 I = Formulação 2 inerte; F3 I = Formulação 3 inerte; F4 Formulação 4 inerte.

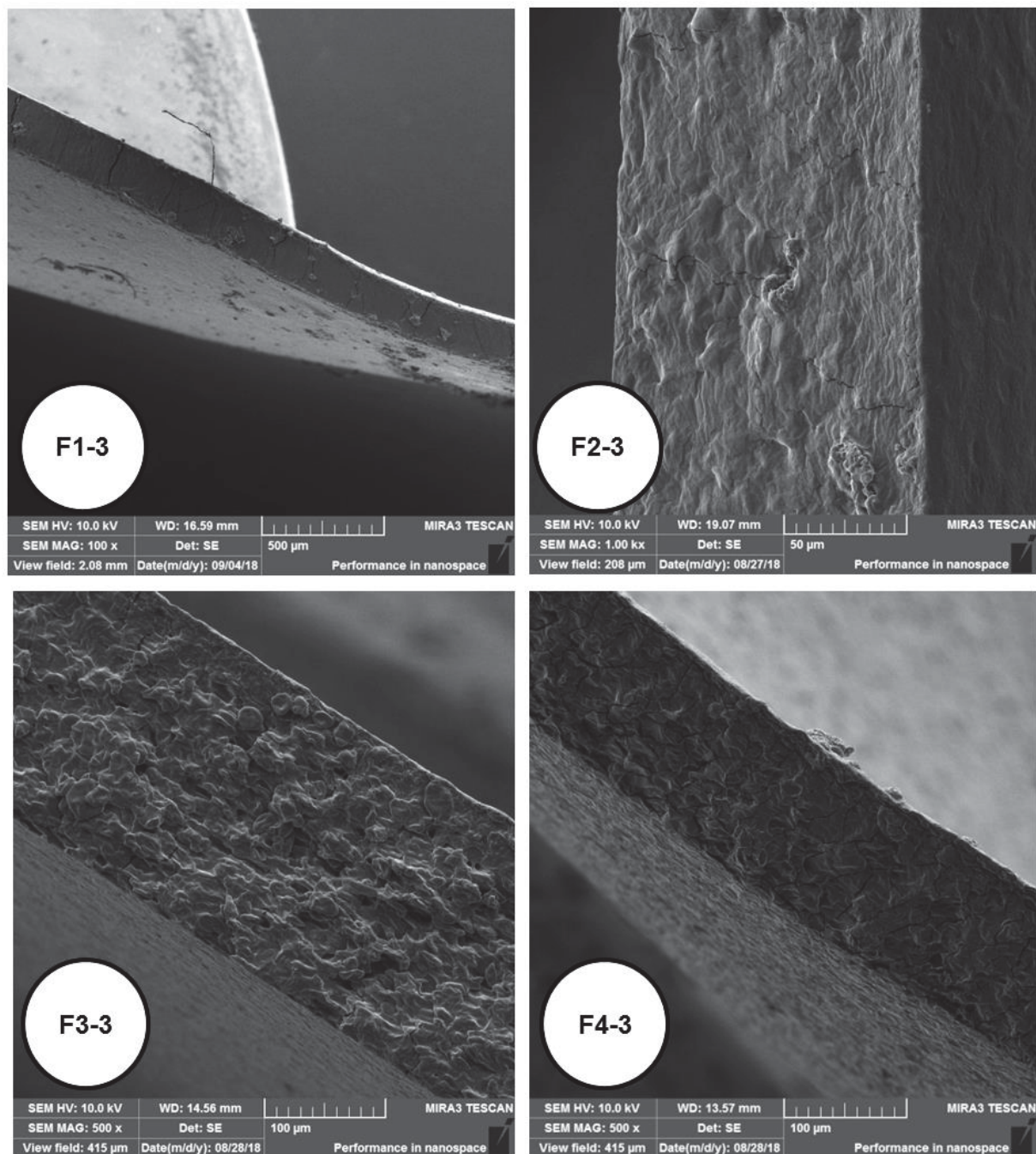
FIGURA 21 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR EMISSÃO DE CAMPO DA SUPERFÍCIE DOS FILMES COM EXTRATO



FONTE: a autora (2018).

NOTA: F1 3% = Formulação 1 com extrato a 3%; F2 3% = Formulação 2 com extrato a 3%; F3 3% = Formulação 3 com extrato a 3%; F4 3% = Formulação 4 com extrato a 3%.

FIGURA 22- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR EMISSÃO DE CAMPO DA FRATURA DOS FILMES COM EXTRATO



FONTE: a autora (2018).

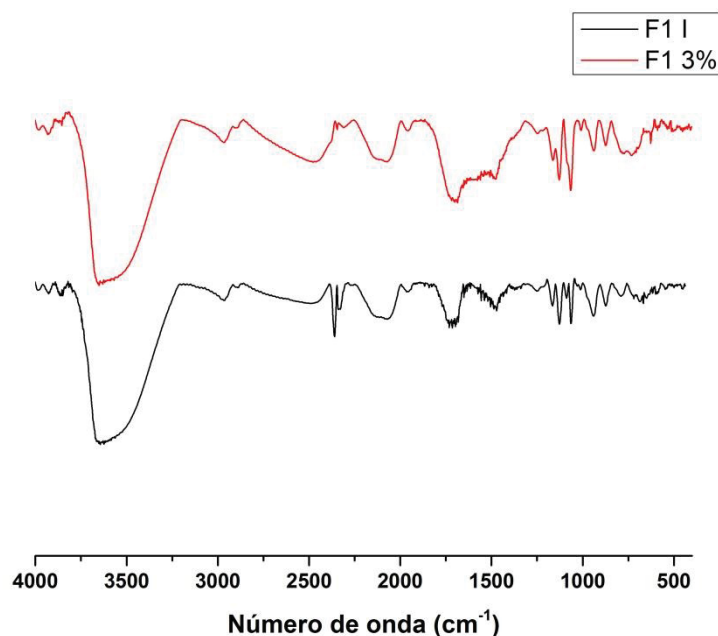
NOTA: F1 3% = Formulação 1 com extrato a 3%; F2 3% = Formulação 2 com extrato a 3%; F3 3% = Formulação 3 com extrato a 3%; F4 3% = Formulação 4 com extrato a 3%;

5.9.4 Avaliação por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

A técnica de espectroscopia de infravermelho fornece informações sobre os grupos funcionais da molécula. A porção de maior utilidade para a análise desses grupos está situada entre 4000 e 400 cm^{-1} . De acordo com Fayad (2010) esta técnica tem sido muito utilizada para investigar interações entre fármacos e polímeros que possam ter ocorrido durante o processo de formação. Com a finalidade de avaliar possível interação entre o extrato bruto e a matriz polimérica, foram analisados espectros dos filmes inertes e contendo o extrato.

Os espectros de IVTF dos filmes apresentaram as bandas características, em concordância com a literatura como pode ser observado nas FIGURAS 23 a 26 e os principais picos estão descritos na TABELA 24.

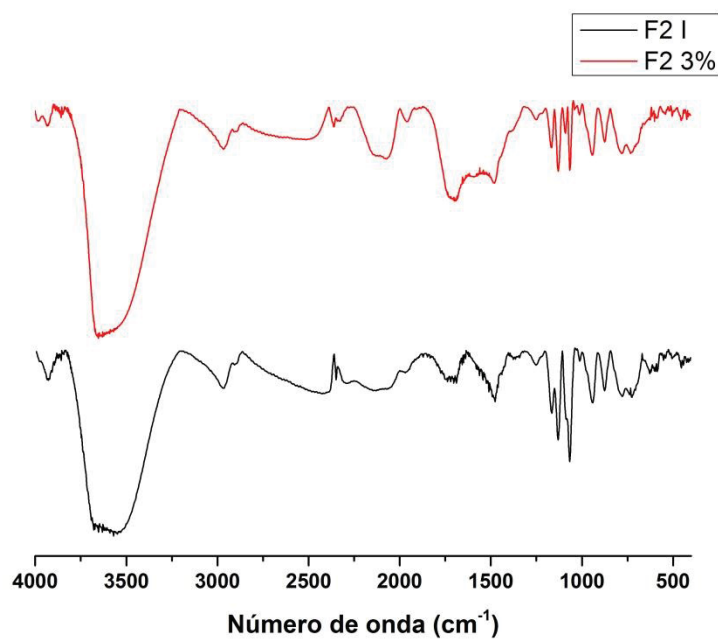
FIGURA 23 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DAS FORMULAÇÕES F1I E F1 3%



FONTE: a autora (2018).

NOTA: F1 I = Formulação 1 inerte; F1 3% = Formulação 1 com extrato a 3%.

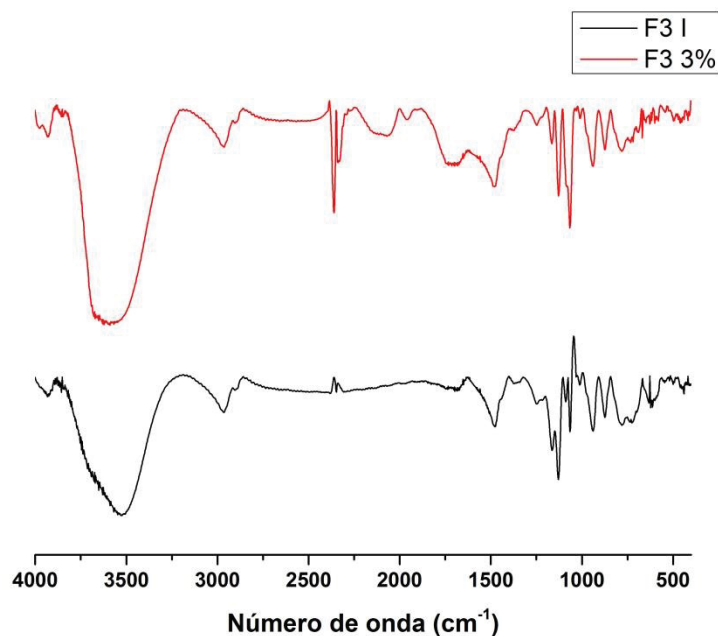
FIGURA 24 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DAS FORMULAÇÕES F2I E F2 3%



FONTE: a autora (2018).

NOTA: F2 I = Formulação 2 inerte; F2 3% = Formulação 2 com extrato a 3%.

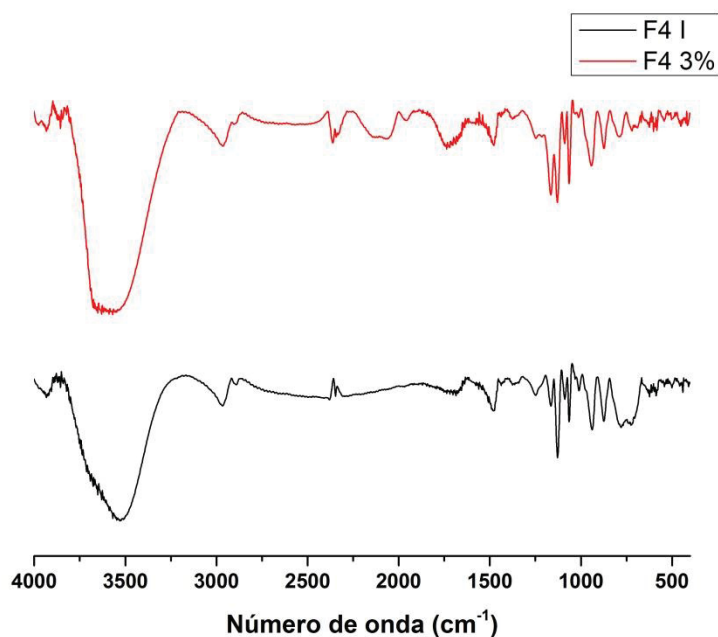
FIGURA 25 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DAS FORMULAÇÕES F3I E F3 3%



FONTE: a autora (2018).

NOTA: F3 I = Formulação 3 inerte; F3 3% = Formulação 3 com extrato a 3%.

FIGURA 26 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DAS FORMULAÇÕES F4 I E F4 3%



FONTE: a autora (2018).

NOTA: F4 I = Formulação 4 inerte; F4 3% = Formulação 4 com extrato a 3%.

TABELA 24 - PRINCIPAIS BANDAS ENCONTRADAS NOS ESPECTROS IVTF DOS FILMES INERTES E COM EXTRATO.

Posição do pico de FTIR (cm ⁻¹)	Modo vibracional	Literatura
780-700	Vibração angular = C-H fora do plano	The Royal Society of Chemistry, 2016
887	Estiramento de CO de compostos glicosídicos	Santos et al., 2003; Kasaai, 2008
937	Estiramento de C-O e C-C	Pavlovic; Brandão, 2003
1066	Deformações de C-OH e CH ₂	Lima et al., 2012
1126	Estiramento de C-O e C-C com alguma contribuição do estiramento C-OH.	Lima et al., 2012
1168	Estiramento de C-O e C-C com alguma contribuição do estiramento C-OH.	Lima et al., 2012
1465	Deformação angular CH ₂	Silverstein; Webster; Kiemle, 2007
1711-1714	Estiramento de C=O	The Royal Society of Chemistry, 2016
1960	Estiramento de C-H	Silverstein; Webster; Kiemle, 2007
2965-2961	Deformação axial CH ₃	Romão et al., 2003
3600-3000	Estiramento de OH	Wolkers et al., 2004

FONTE: a autora (2018).

De acordo com Santos et al. (2003) e Kasaai (2008), bandas na região de 890 cm^{-1} a 1156 cm^{-1} são referentes à estruturas polissacarídicas. Nos filmes analisados, foram observadas bandas próximas a 887 cm^{-1} , podendo ser referente ao estiramento de CO de compostos glicosídicos (KASAAI, 2008).

A banda situada entre 1711 cm^{-1} e 1714 cm^{-1} se refere a estiramento de C=O de amida e está presente nas formulações contendo polilisina (F1 e F2).

Todos os filmes apresentaram bandas na região de $1064\text{--}1168\text{ cm}^{-1}$. As bandas na região $1200\text{ a }1000\text{ cm}^{-1}$ são consideradas bandas características do amido e são atribuídas a vibrações de deformação axial de C-O em alcoóis e a vibrações de deformação axial do sistema O-C-O (LIMA et al., 2012).

Bandas observadas em $1068, 1064, 937, 940, 943\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas às deformações C-OH e CH₂. O grupo C-O-C (éter) presente em um anel de seis átomos (como no monômero de glucose) absorve em $1150\text{--}1085\text{ cm}^{-1}$ e dependendo de deformação axial (simétrica ou assimétrica) essas bandas irão se deslocar (LIMA et al., 2012).

A banda larga na região de $3600\text{--}3000$ observada em aproximadamente 3550 cm^{-1} em todas as amostras pode ser atribuída ao estiramento das ligações O-H relacionado às ligações de hidrogênio estabelecidas entre os componentes dos filmes de amido (WOLKERS et al., 2004). Nas formulações contendo extrato houve deslocamento dessa banda para valores maiores como 3597 e 3577 cm^{-1} .

Apenas os filmes com extrato bruto apresentaram banda em 1960 , que segundo a literatura atribui-se a estiramento de CH (LIMA et al., 2012).

Os espectros obtidos são muito semelhantes entre si, mas comparando-se os espectros, podem ser observadas pequenas diferenças na forma e intensidade de algumas bandas, isso pode ser justificado pela adição do extrato ao filme polimérico.

5.9.5 Caracterização das propriedades mecânicas: teste tensão de ruptura dos filmes

Com o objetivo de investigar as propriedades mecânicas dos filmes, os valores de σ , Y e ϵ foram determinados por testes de tração e estão mostrados na TABELA 25 expressos através da média das triplicatas.

TABELA 25 - PROPRIEDADES MECÂNICAS DOS FILMES OBTIDOS

Formulação	Tensão na ruptura (σ) (N/mm ² \pm DP)	Deformação (ϵ) (% \pm DP)	Módulo de Young (Y) (N/mm ² \pm DP)
F1 I	0,278 \pm 0,134	121,121 \pm 4,282	24,220 \pm 2,849
F2 I	0,523 \pm 0,333	100,175 \pm 4,743	20,035 \pm 0,948
F3 I	0,208 \pm 0,100	67,171 \pm 13,102	12,234 \pm 2,620
F4 I	0,378 \pm 0,114	79,988 \pm 6,641	15,058 \pm 2,655
F1 3%	0,226 \pm 0,073	122,029 \pm 5,415	24,405 \pm 1,082
F2 3%	0,677 \pm 0,298	102,437 \pm 3,779	20,487 \pm 0,755
F3 3%	0,223 \pm 0,035	50,761 \pm 8,020	10,152 \pm 1,134
F4 3%	0,374 \pm 0,066	63,105 \pm 3,952	12,621 \pm 0,559

FONTE: a autora (2018).

NOTA: F1 I = Formulação 1 inerte; F2 I = Formulação 2 inerte; F3 I = Formulação 3 inerte; F4 I = Formulação 4 inerte; F1 3% = Formulação 1 com extrato a 3%; F2 3% = Formulação 2 com extrato a 3%; F3 3% = Formulação 3 com extrato a 3%; F4 3% = Formulação 4 com extrato a 3%;

Os resultados indicam que os valores obtidos para a tensão na ruptura (σ) foram semelhantes para todas as formulações. No trabalho realizado por Isotton (2013) observou-se que a tensão na ruptura dos filmes de amido eterificado, com plastificantes sorbitol e glicerol, diminuíram com o aumento do teor dos plastificantes.

Os filmes apresentaram baixo σ , porém alta deformação na ruptura (ϵ) apresentando valores que variam de 50 a 122%. As formulações F3 3% e F4 % foram as que apresentaram menores valores comparando com suas formulações controle. Altos valores de alongação sugerem boa flexibilidade e tenacidade.

As moléculas dos plastificantes apresentam tamanho reduzido, o que favorece a ocupação dos espaços entre as cadeias dos polímeros, formando com eles ligações de hidrogênio e dessa forma bloqueando as ligações de hidrogênio inter e intramoleculares entre suas cadeias. Quando se adiciona glicerina às formulações, ocorre uma redução das forças intermoleculares entre as cadeias de amido, o que confere a flexibilidade aos filmes (RABELO 2000). Normalmente, a presença de plastificantes ocasiona uma diminuição da σ e um aumento de ϵ . (SOBRAL, 2000).

O módulo Young (Y) é a relação entre a resistência à tração e a porcentagem de alongamento e indica a rigidez do filme, ou seja, quanto maior o valor do módulo Young mais rígido será o filme (OLIVEIRA, 1996). Representa a máxima tensão que o material resiste sem sofrer deformação

permanente. O Y da pele é de 4,6 – 20 Mpa, para ensaios de tração e pode variar conforme a idade, a cor da pele, presença de lesões e genética (MORGADO; AGUIAR-RICARDO; CORREIA, 2015). Neste sentido, verificou-se que as formulações contendo ϵ -PLL (F1 I e F2 I e F1 3% e F2 3%) apresentaram valores maiores. A adição de polímeros sintéticos pode melhorar as propriedades mecânicas dos filmes, aumentando sua resistência (MOGAŞANU; GRUMEZESCU, 2014). Todas as formulações apresentaram valores de Y maiores que o da pele humana.

5.9.6 Determinação da porosidade e taxa de transmissão de vapor de água

A presença de poros em sistemas transdérmicos é importante porque permite a proliferação celular e trocas gasosas de nutrientes e de fluidos. Conforme descrito em literatura Antunes et al (2015) e Morgado, Aguiar-Ricardo, Correia (2015) taxas entre 60-90% de porosidade são as mais indicadas. As formulações F1 I e F2 I apresentaram 34,6% e 27%, já F3 e F4 obtiveram valores de 11 e 23%, respectivamente. Os valores não variaram para formulações com extrato bruto de *B. erioclada*.

Em 1991, Hutchinson e colaboradores realizaram uma pesquisa na qual foi comparada o uso de curativos oclusivos e não oclusivos. Estes pesquisadores verificaram que curativos oclusivos além de criar um ambiente de reepitelização, favoreciam também um ambiente que permitia um mecanismo de defesa eficiente contra microrganismos. Neste sentido, é mais viável impedir a entrada de bactéria no local inflamado/lesionado do que tentar controlar o crescimento das mesmas depois de instaladas na lesão. Dessa forma, filmes poliméricos oclusivos apresentam vantagens.

A TTVA de filmes depende das suas propriedades estruturais (espessura e porosidade), e das propriedades químicas dos materiais que são utilizados. Condições externas como temperatura e umidade relativa do ar também podem influenciar na TTVA. Um das funções da pele quando intacta é servir de barreira à perda de água, quando a pele está danificada, esta e outras funções são perdidas. O valor de TTVA da pele normal é de 204 mL/m²/dia (MENG et al., 2010; LIN et al., 2013; VOWDEN; VOWDEN, 2014; MORGADO; AGUIAR-RICARDO; CORREIA, 2015).

Os valores de TTVA encontrados para as formulações dos filmes de amido inertes e com extrato estão descritas na TABELA 26.

TABELA 26: VALORES DE TTVA PARA OS FILMES DE AMIDO

Formulação	TTVA mL/m ² /dia
F1 I	176,28 ± 0,153
F2 I	180,54 ± 0,655
F3 I	182,26 ± 0,568
F4 I	176,18 ± 0,190
F1 3%	179,77 ± 0,370
F2 3%	175,47 ± 1,94
F3 3%	181,45 ± 0,555
F4 3%	179,100 ± 0,358

FONTE: a autora (2018).

NOTA: F1 I = Formulação 1 inerte; F2 I = Formulação 2 inerte; F3 I = Formulação 3 inerte; F4 I = Formulação 4 inerte; F1 3% = Formulação 1 com extrato a 3%; F2 3% = Formulação 2 com extrato a 3%; F3 3% = Formulação 3 com extrato a 3%; F4 3% = Formulação 4 com extrato a 3%;

Os filmes de amido e o plastificante utilizado são hidrofílicos. Essas características assim como a espessura dos filmes, influenciam intensamente as propriedades de barreira, (BIQUET; LABUZA, 1988; KAMPER; FENNEMA, 1984). A incorporação do extrato nos filmes não modificou sua TTVA.

5.9.7 Avaliação da atividade antimicrobiana

Apenas as formulações F1 I, F2 I, F1 3% e F2 3% apresentaram halo de inibição de 9 mm para todos os microrganismos testados, essas formulações apresentam na sua composição a ϵ - PLL a qual possui um amplo espectro antimicrobiano, incluindo bactérias Gram positivas e Gram negativas e fungos (LI et al., 2014).

O aumento na concentração do EB nos filmes de amido seria uma alternativa para que viesse a apresentar atividade antimicrobiana, ou até mesmo a adição de outras substâncias com ação antimicrobiana já comprovada.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espécie *Baccharis erioclada* DC., na pesquisa fitoquímica preliminar evidenciou a presença de grupos de metabólitos secundários como: flavonoides, esteroides e taninos.

O óleo essencial de *B. erioclada* teve rendimento de 0,4% e sua composição química elucidou 31 compostos, sendo os sesquiterpenos oxigenados a principal classe de componentes, e tendo como compostos majoritários a turmerona, o fokienol, o ledol e o santalol.

Nos diferentes ensaios antioxidantes realizados o extrato bruto destacou-se em comparação com as frações.

O óleo essencial de *B. erioclada* apresentou uma porcentagem de atividade antioxidante maior que a rutina padrão pelo método do fosfomolibdênio e uma excelente atividade para o teste de poder de redução.

O extrato bruto apresentou excelentes resultados no doseamento de fenólicos e flavonoides totais, o que justifica seu poder como antioxidante.

Nenhuma amostra toxicidade frente à *Artemia salina* com valores superiores a 1000 µg/mL.

Foi possível a identificação da flavona hispidulina através dos dados obtidos no espectro de RMN H¹

Por meio de análises cromatográficas, foi realizada a quantificação da hispidulina no extrato bruto bem como, o desenvolvimento e a validação analítica.

O método analítico desenvolvido e validado neste trabalho demonstrou ser adequado para a quantificação do flavonoide. Os parâmetros estabelecidos na validação demonstraram que o método é seletivo, linear, preciso, exato e robusto.

Os filmes obtidos em todas as formulações propostas apresentaram as mesmas características, apresentando-se com uma matriz polimérica lisa e homogênea e com elevados valores de deformação, o que indica a boa flexibilidade. As formulações apresentaram características semi-oclusivas.

Os filmes contendo poli-lisina apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados.

Desta forma, pode-se concluir que os filmes produzidos com poli-lisina apresentam potencial para o tratamento tópico de processos inflamatórios.

REFERÊNCIAS

ABAD, M. J.; BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. **Caldasia**, v. 7, p. 76-96, 2007.

ABATTI, L.; DOMINGUES JUNIOR, N. S. Estudo do comportamento de compostos de PVC com adição de amido. **Polímeros**, v. 21, n.2, p.151-155, 2011.

ADAMS, R.P. **Identification of essential oils components by gas chromatography mass spectroscopy**. 4.ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 804p, 2007.

AGOSTINI, F. et al. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 3, p. 215-220, 2005.

AJAIYEGBA, E.O. et al. Larvicidal activity of turmerone-rich essential oils of *Curcuma longa*. Leaf and Rhizome from Nigeria on *Anopheles gambiae*. **Pharmaceutical Biology**, v.46, p.279-282, 2008.

AKAIKE, S. et al. New *ent*-clerodane diterpene from the aerial parts of *Baccharis gaudichaudiana*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, p. 197-199, 2003.

AL-HASSAN, A. A.; NORZIAH, M.H. Starchegelatin edible films: water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. **Food hydrocolloids**, v. 26, p. 108-117, 2012.

ALLEN, J.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 9 ed. Porto alegre: Artmed Editora Ltda, 2011, 716 p.

ALVES, C.Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.

ALVES, E.G. et al. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting, D882-10 Annual book of ASTM, Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials. 2010, 10p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. Standard test method for tensile properties of plastic (metric), D638M-93. Annual book of ASTM, Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials. 1993.

_____. Standard test method for water vapor transmission of material – E96-95, Annual book of ASTM, Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials. 1995.

- ANTUNES, B. P. et al. Chitosan/arginine-chitosan polymer blends for assembly of nanofibrous membranes for wound regeneration. **Carbohydrate polymers**, v. 130, p. 104-112, 2015.
- ARAÚJO, A. A. S. et al. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.2, p. 269-277, 2006.
- ARAÚJO, G. K. P. **Desenvolvimento de Filmes Biodegradáveis de Amido Incorporado com Extrato de Própolis**. 43f. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.
- ARGOTI, J. C. et al. On-Line activity screening for radical scavengers from *Baccharis chilco*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, p. 189-197, 2013.
- ARVANITOYANNIS, I. et al. Biodegradable films made from low-density polyethylene (LDPE), rice starch and potato starch for food packaging applications: part. 1. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, n. 1, p. 89-104, 1998.
- AYRES, M. C. C. et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2008.
- BAGGIO, C. H. et al. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC. in rats. **Pharmacological Research**, v. 47, p. 93-98, 2003.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oil: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-75, 2008.
- BANERJEE, A. et al. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of red blood cells. **Chemico-Biological Interactions**, v.172, p.134-139, 2008.
- BARROSO, G.M. Compositae-subtribo Baccharidineae Hoffmann. Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. **Rodriguesia**, v. 28, n. 40, p. 1-273, 1976.
- BARROSO, G.M.; BUENO, O. Compostas - 5. Subtribo: Baccharidineae. In: Reitz, R. (ed.). Flora Ilustrada Catarinense. **Herbário Barbosa Rodrigues**, Itajaí, Fasc. COMP. p. 765-1065, 2002.
- BELGACEM, M. N. GANDINI, A. The State of the Art. In: BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**. Oxford: Elsevier, 2008.
- BERTOLDI, A. D. et al. Self-medication among adolescents aged 18 years: The 1993 Pelotas (Brazil) birth cohort study. **Journal of Adolescent Health**, v. 55, p.175-181, 2014.

BETIM, F.C.M. **Estudo fitoquímico e biológico da espécie Ocotea nutans (Ness) Mez, LAURACEAE**. 103f. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

BIELEFELD, K.A.; AMINI-NIK S.; ALMAN B.A. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. **Cellular and molecular life sciences**, v.70, n.12, p. 2059-81, 2013.

BLAINSKI, A.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. **Molecules**, v.18, p. 6852-6865, 2013.

BO, T. et al. Metabolomic analysis of antimicrobial mechanisms of ϵ - Poly L Lysine on *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 4454-4465, 2014.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução a química de alimentos**. 2 ed. São Paulo: Livraria Varela, 1995.

BOBEK, V.B. et al. Comparative pharmacobotanical analysis of *Baccharis caprariifolia* DC. and *B. erioclada* DC. from Campos Gerais, Paraná, Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.34, p.1396-402, 2015.

BOGO, C.A. et al. Comparative analysis of essential oils of *Baccharis* L.: a review. **Revista Stricto Sensu**. v. 1, p. 01-11, 2016.

BOIX, Y. F. et al. Volatile compounds from *Rosmarinus officinalis* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC. Growing in southeast coast of Brazil. **Química Nova**, 33, n. 2, p. 255-257, 2010.

BOLDT, P. E. ***Baccharis* (Asteraceae): a review of its taxonomy, phytochemistry, ecology, economic status, natural enemies and the potential for its biological control in the United States**. College Station: **Texas Agricultural Experimental Station**, p. 32, 1989.

BOLLER, S. et al. Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 262–266, 2010.

BORELLA, J. C.; FONTOURA, A. Avaliação do perfil cromatográfico e do teor de flavonoides em amostras de *Baccharis trimera* (Less.) DC., Asteraceae (carqueja) comercializadas em Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 63-67, 2002.

BORGIO, J. et al. Influência dos processos de secagem sobre o teor de flavonoides e na atividade antioxidante dos extratos de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., Asteraceae. **Brazilian Journal Pharmacognosy**, v. 20, p. 12-17, 2010.

BORGES, R. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract from *Synadenium umbellatum* Pax. (Euphorbiaceae) Leaves

and Its Fractions. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Disponível em: [//dx.doi.org/10.1155/2013/715650](https://doi.org/10.1155/2013/715650).

BORGES, D.B. et al. Comparação de metodologias da Farmacopeia Brasileira para determinação de água em matérias-primas vegetais, e validação de determinação de água em analisador de umidade para *Calendula officinalis* L.; *Foeniculum vulgare* Miller, *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek e *Passiflora alata* Curtis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n. 3, 0. 229-236, 2005.

BRASIL. Resolução RDC n° 166 de julho de 2017 Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras p., 2017. Brasília: Diário Oficial da União.

BRITO, G. F. et al. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.6.n. 2 , p. 127-139, 2011.

BUDEL, J. M. **Análise morfoanatômica de partes vegetativas aéreas de espécies de *Baccharis* L. (Asteraceae) do sul do Brasil**. 155f. 2009. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BUDEL, J.M. et al. Composition of essential oils and secretory structures of *Baccharis anomala*, *B. megapotamica* and *B. ochracea*. **Journal of Essential Oil Research**, v.24, p.19-24, 2012.

BUDEL, J. M., et al. Essential Oils of Five *Baccharis* Species: Investigations on the Chemical Composition and Biological Activities. **Molecules**, v.23, n.10, p.2620, 2018.

CAMPAGNER, M. R. et al. Filmes Poliméricos Baseados em Amido e Lignossulfonatos: Preparação, Propriedades e Avaliação da Biodegradação. **Polímeros**, v. 24, n. 6, p. 740-751, 2014.

CAMPOS, F.R. et al. *Baccharis* (Asteraceae): Chemical Constituents and Biological Activities. **Chem. Biodiversit.**, v. 13, 1-17, 2016.

CALLE, A. et al. Flavonoides de *Baccharis boliviensis*. **Revista Boliviana de Química**, v. 29, n. 2, p. 158-163, 2012.

CARNEIRO, M. A. A.; FERNANDES, G. W. As relações conflituosas entre plantas e insetos. **Ciência Hoje**, v. 20, p. 33-39, 1996.

CARVALHO, R. M. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes à base de gelatina**. 128p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade de Campinas, Campinas, 1997.

CARVALHO, J.L.S. **Desenvolvimento tecnológico de insumos, isolamento de marcadores e validação analítica dos derivados de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae**. 182f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CAZAROLLI, L. H. et al. Flavonoids: prospective drug candidates. **Mini Review Medicinal Chemistry**, v.8, n.13, p.1429-40, 2008.

CERVERA, M. F. et al. Solid-state and mechanical properties of aqueous chitosan-amylose starch films plasticized with polyols. **American assoaciations of pharmaceutical sciientists pharm Sci Tech**, v.5, p.1-6, 2004.

CHANG, C.C. et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.10, n.3, p.178- 182, 2002.

CHANG, Y. P.; KARIM, A. A.; SEOW, C. C. Interactive plasticizing-antiplasticizing effects of water and glycerol on the tensile properties on tapioca starch films. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 1, p.1-8, 2006.

CHANG, S-S et al. Control of foodborn pathogens on ready-to-eat roast beef slurry by ϵ -polylysine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. 236-241, 2010.

CHEW, Y.L et al. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of *Leguminosae* medicinal plants in Peninsular Malaysia. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.11, n.12, 2011.

CHOI, C.W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v.163, 2002, p.1161-1168, 2002.

CHORILLI, M. et al. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n.1, p. 7-13, 2007.

CIOBANU, C. et al. Properties of lignin–polyurethane films prepared by casting method. **Industria Crops Products**, v.20, p.231-241, 2004.

COELHO, M. P. G. et al. Antiarthritic effect and subacute toxicological evaluation of *Baccharis genistelloides* aqueous extract. **Toxicology Letters**, v. 154, p. 69-80, 2004.

CORRÊA, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas VI: CAR-E. **Imprensa Nacional**, p.173, 1984.

COSTA, D. M. A. et al. **Desenvolvimento e caracterização de filmes à base de amido de feijão macáçar (*Vigna unguiculata* (L.) Wap)**. Holos, v. 07, 2017.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**.3 v. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

COTINGUIBA, G.G. et al. Métodos de Avaliação da Defesa Antioxidante: UmaRevisão de Literatura. **Cient Ciênc Biol Saúde**, v.15, n.3 p. 231-237, 2013.

COULTATE, T. P. **Food: The chemistry of its componentes**. Royal society of Chemistry. p. 43-45, 2002.

COUGHLAN, M.P.; RAJAGOPALAN, K.V.; HANDLER, P. The Role of Molybdenum in Xanthine Oxidase and Related Enzymes: Reactivity with Cyanide, Arsenite, and Methanol. **Journal of Biological Chemistry**, v.244, n.10, p. 2658-2663, 1969.

COUTINHO, M. A. S. et al. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista virtual de química**, v.1, n. 3, p. 241-256, 2009.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**, 2.ed. New York: New York Botanical Garden, 1988.

CSOKA, G. et al. Application of sucrose fatty acid esters in transdermal therapeutic systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.65, n.2, p. 233-7, 2006.

CUQ, B. et al. Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 6, p. 1369-1374, 1995.

DE ASSIS, L.T.C. et al. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (1836) and its constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 148, p. 24-29, 2015.

DE OLIVEIRA, S.Q. et al. Screening of antibacterial activity of south Brazilian *Baccharis* species. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, 434-438, 2005

DE SOUZA, T.P.; LIONZO, M.I.Z.; PETROVICK, P.R. Avaliação da redução da carga microbiana de droga vegetal através do processamento tecnológico: decocção e secagem por aspersão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 94-98, 2006.

DAI, J.; MUMPER, R.J. Plant Phenolic: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules** .v.15, n.10, p.7313-52. 2010.

DIAS, L. F. D. et al. Antiulcerogenic and antioxidant activities of *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1B, p. 309-14, 2009.

DIAS, A.B. **Desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis obtidos de amido e de farinha de arroz**. 116f. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia de alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

DI CARLO, G. et al. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life sciences**.v.65, n. 4, 337-353, 1999.

DITTMER, M. Transdermale therapeutische systeme. **Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten**, n.21, p. 365–377, 1998.

DONALD, A. M. **Starch in Food: Structure, function and Applications**. Chapter 5: Understanding starch structure and functionality. Professor Anne-Charlotte Eliasson Woodhead Publishing, 2004.

DUNCAN, D.B. Multiple range and multiple F testes. **Biometrics.**, v.11, p.1-42, 1955.

ELVIRA, C. et al. Starch Based Biodegradable Hidrogels with Potential Biomedical Aplications as Drug Delivery Systems. **Biomaterials**, v.23, p. 1955-66. 2002.

EMERENCIANO, V. P. et al. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 947-957, 2001.

FABIANE, K. C. et al. Physicochemical characteristics of the essential oils of *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira deFarmacognosia**, v.18, n.2, p.197-203, 2008.

FABRI, R.L et al. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **RevistaBrasileiradeplantasmedicinais**, v.13, n.2, pp.183-189, 2011.

FAKHOURI, F.M. et al. Edible films made from blends of manioc starch and gelatin – Influence of different types of plasticizer and diferent levels of macromolecules on their properties. **LWT- Food Scienc and Technology**, v. 49, p. 149-154, 2012.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 6ª ed., Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **São Paulo: Atheneu**, 2019.

FAYAD, S.J. **Obtenção e caracterização de micro e nanopartículas a base de proteína isolada de soja**. 2010. 106f. Dissertação (Mestrado em química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

FERRACINI, V.L. et al. Essential oils of seven Brazilian *Baccharis* species. **Journal of Essential Oil Research**, v.7, p.355-367, 1995.

FERRÁNDIZ, M.L. et al. Hispidulin protection against hepatotoxicity induced by bromobenzene in mice. **Life Sciences**, v. 55, n. 8, p. 145-150, 1994.

FERRONATTO, R. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 224-230, 2007.

FIGUEIREO-RINHEL, A. S. G. et al. Inhibition of the human neutrophil oxidative metabolismo by *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) is influenced by seasonality and the ratio of caffeic acid to other phenolic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 655–664, 2013.

FINNEY, D.J. Probit Analysis. Cambridge: Cambridge University Press, 1956.

Flavonoides e Antocianos. Disponível em: http://www.sbfgnosia.org.br/Ensino/flavonoides_e_antocianinos.html
Acesso em 20 de setembro de 2017.

FLORÃO, F.A. et al. Essential oil from *Baccharis* species (Asteraceae) have anti-inflammatory effects for human cells. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, p.561-570, 2012.

FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. Jardim Botânico do Rio de Janeiro <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>>, cited in: 06 June 2018.

FLORES, M. P.; CASTRO, A. P. C.R.; NASCIMENTO, J. S. Topical analgesics. **Revista Brasileira de Anestesiologia**.v. 62, n. 2, p. 244-252, 2012.

FRANCO, C. M. L. et al. **Propriedades gerais do amido**. Séries: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. São Paulo: Fundação Cargill. v. 1, 2001.

FORD, J.L., TIMMINS, P. **Pharmaceutical Thermal Analysis: Techniques and applications**. John Wiley & Sons, New York, p.108-309, 1989.

FRANCHETTI, S. M.M.; MARCONATO, J.C. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v.29 n.4, 2006.

FUKUDA, M. et al. Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity.**Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 10, p. 1465-1468, 2006.

GALDEANO, M.C. **Filmes e laminados biodegradáveis de amido de aveia com diferentes plastificantes, produzidos por casting e extrusão**. 2007. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina.

GALINDO, L. A; PULTRINI, A. M; COSTA, M. Biological effects of *Ocimum gratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil. **Journal of Natural Medicines**, v. 64, n. 4, p. 436-41, 2010.

GARCIA, M. A.; MARTINO ARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Microstructural characterization of plasticized starch-based films.**Starch/Stärke, Weinheim**, v. 52, n. 4, p. 118-124, 2000.

GARCIA, F. A. de O. et al. A comparative study of two clerodane diterpenes from *Baccharis trimera* (Less.) DC. on the influx and mobilization of intracellular calcium in rat cardiomyocytes. **Phytomedicine**, v. 21, n. 8-9, p. 1021-1025, 2014.

GARG, D. et al. In-vitro antioxidant activity and phytochemical analysis in extracts of *Hibiscus rosa-sinensis* stem and leaves. **Free radicals and antioxidants**, v. 2, n. 3, p. 41-46, 2012.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de histologia em cores**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, 576 p.

GAUDIN, S. et al. Antiplasticisation and oxygen permeability of starch-sorbitol films. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, n. 1, p. 33-37, 2000.

GIULIANO, D. A.; FREIRE, S. E. Nuevas secciones en *Baccharis* (Asteraceae, Astereae) de América del Sur. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 98, p. 331-347, 2011.

GOKBULUT, A. Determination of Hispidulin in the flowers of *Inula viscosa* (L.) Aiton Using HPLC and HPTLC Methods. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, 13(2): 159-166, 2016.

GOSAIN, A.; DIPIETRO, L.A. Aging and wound healing. *Word Journal of Surgery*. v.28, p.321-326, 2004. **Surgery**. v.26, n.2, p. 31-37.

GOMES, M.E. et al. Alternative Tissue Engineering Scaffolds Based on Starch: processing methodologies, morphology, degradation and mechanical properties. **Material Science & Engineering**, v.20, p. 19-26. 2002.

GOMES, M. L. S. et al. A Simple RP-HPLC/UV Method for Determination of Cilostazol in Polymeric Nanoparticles Suspensions: Development and Validation. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 34, n. 4, p.803-809, 2015.

GONTARD, N. **Films et enrobages comestibles: étude et amélioration des propriétés filmogènes du gluten**. 174f. 1991. Thèse (Docteur em Biochimie, Biologie cellulaire at moléculaire – Science des Aliments) - Université Montpellier, France, 1991.

GRECCO, S. dos S. et al. In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 141–145, 2012.

GUENET, J.M. **Thermoreversible Gelation of Polymer and biopolymers**. Academic Press INC. 1992.

GUESENS, B. et al. Lipid-mediated gene delivery to the skin. **European journal pharmaceutical sciences**, v. 43, n. 4, p. 199-211, 2011.

GUEST, E. Transdermal drug delivery: A new frontier in the administration of therapeutic drugs to veterinary species. **The Veterinary Journal**, v.172, p. 200-201, 2006.

HADAD, G. M.; EMARA, S.; MAHMOUD, W. M. Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for the determination of paracetamol with dantrolene or/and cetirizine and pseudoephedrine in two pharmaceutical dosage forms. **Talanta**, v. 79, n. 5, p.1360-1367, 2009.

HADGRAFT, J.; LANE, M.E. Skin permeation: The years of enlightenment. **International Journal of Pharmaceutics**, v.305, p. 2-12, 2005.

HAYASHI, S. S. **Determinação qualitativa e quantitativa de metabólitos secundários de *Malva sylvestris* em extratos e especialidades farmacêuticas**. 121f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná, 2012.

HALLIWEL, B. et al. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 617, 1995.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & therapeutics**, v.96, n.2-3, p; 67-202, 2002.

HEIDEN, G. et al. Comercialização de carqueja por ervateiros da zona central de Pelotas, Rio Grande do Sul. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, p. 50-57, 2006.

HEIDEN, G.; BAUMGRATZ, J. F. A.; ESTEVES, R. L. *Baccharis* subgen. Molina (Asteraceae) no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguesia**, v. 63, p. 649-687, 2012.

HEIDEN, G.; LEONI, L. S.; NAKAJIMA, J. N. *Baccharis magnifica* (Asteraceae, Astereae): a striking new species endemic to the summits of Serra do Caparaó, southeastern Brazil. **Phytotaxa**, v. 162, p. 211–216, 2014.

HEIDEN, G.; SCHNEIDER, A. A., *Baccharis*. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available from: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5151> (accessed 28 April 2014), 2014.

HEIDEN, G.; IGANCI, J. R. V.; MACIAS, L. *Baccharis* sect..*Caulopterae* (Asteraceae, Astereae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, p. 943-983, 2009.

HEINZMANN, B.M.; SPITZER, V.; SIMÕES, C.M.O. **Óleos essenciais**. In: Simões CMO, Schenkel EP, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR, editors. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre: Artmed; 167-184p, 2017.

HENRIQUE, C. M; CEREDA, M.P.; SARMENTO, S.B.S. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.1, p. 231-240, 2008.

HERRERIAS, T. et al. Effects of natural flavones on membrane properties and cytotoxicity of HeLa cells. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n.20, v.3, p. 403-408, 2010.

HIRAKI et al. Use of ADME studies to confirm the safety of ϵ - polylysine as a preservative in food. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 37, p. 328-340, 2003.

HOLETZ, F. B., et al. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the **Treatment of Infectious Diseases**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

HUBER, L.S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Flavonois e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alim.Nutr**, v. 19, n.1, p. 97-108, 2008.

HUTCHINSON, J.J.; LAWRENCE, J.C. Wound infection under occlusive dressings.**Journal of Hospital Infections**, v. 17, p. 83-94, 1991.

ICH. ICH Topic Q2 (R1) **Validation of Analytical Procedures**: Text and Methodology. International Conference on Harmonization, v. 4, p. 17, 2005.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V.I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food chemistry**.v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011.

ISOTTON, F. S. 100f. **Desenvolvimento e caracterização de filmes de amido de milho eterificado com plastificante glicerol, sorbitol e poli (álcool vinílico)**. Dissertação (Mestrado). Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, 2013.

JAIME, M. F. V. et al. In vitro antiviral activity of plant extracts from Asteraceae medicinal plants.**Virology Journal**, v. 10, n.245, p. 2-10, 2013.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 84 p.

KAPPEL, V. D. et al. Short and long-term effects of *Baccharis articulata* on glucose homeostasis.**Molecules**, v. 17, p. 6754-6768, 2012.

KARAM, T. K. et al. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.15, n.2, p. 280-286, 2013.

KASSAI, M.R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. **Carbohydrate polymer**, v. 71, p. 497-508, 2008.

KASEEM, M.; HAMAD, K.; DERI, F. Thermoplastic starch blends: A review of recent works. **Polymer Science Series A**, v.54, n 2, p.165–176, 2012.

KIM, H. P. et al. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms.**Journal of Pharmacological Sciences**, v.96, n.3, p. 229-45, 2004.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**.2. ed. São Paulo: Basf, 1999.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; DE MELLO, J. C. P. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var. sorbilis (guaraná). **Talanta**, v. 88, p.502-506, 2012.

KORBES, V. C. **Plantas Medicinais**. 51ed. Francisco Beltrão: Editora Grafite, 1995.

KORKINA LG; AFANAS'EV IB. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. **Advances in Pharmacology**, v.38, p.151-63, 1997.

KHODDAMI, A.; WILKES, M.A.; ROBERTS, T.H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. **Molecules**, v. 18, n. 13, p 2328-2375, 2013.

KUBO, I.; MATSUMOTO, A. Secreted oleanolic acid on the cuticle *Olea europaea* (Oleaceae); a chemical barrier to fungal attack. **Experientia**, v. 40, p. 937, 1984.

KURDELAS, R.R. et al. Chemical composition, anti-insect and antimicrobial activity of *Baccharis darwinii* essential oil from Argentina, Patagonia. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 261– 267, 2012.

LA CASA C. et al. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n.1-2, p.45-53, 2000.

LAGO, J.H.G. et al. Composição química dos óleos essenciais das folhas de seis espécies do gênero *Baccharis* de "Campos de Altitude" da mata atlântica paulista. **Química Nova**, v. 31, p. 727-30, 2008.

LAJOLO, F.M.; MENEZES, E. W. **Carboidratos em alimentos regionais Iberoamericanos**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006, 648p.

LAROTONDA, F.D.S. et al. Hygroscopicity and water vapor permeability of kraft paper impregnated with starch acetate. **Journal of food engineering**, v.71, p.394-402, 2005.

LEMO, M. et al. *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 603-608, 2007.

LEONOR, I.B. et al. In vitro bioactivity of starch thermoplastic/hydroxyapatite composite biomaterials: an in study using atomic force microscopy. **Biomaterials**, v.24, p. 579-85. 2003.

LEWAN, L.; ANDERSSON, M.; MORALES, P.G. The use of *Artemia salina* in toxicity test. **Alternatives to laboratory animals ATLA**, v. 20, p. 297-301, 1992.

LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. **Biodiversidade Brasileira: síntese do estado atual do conhecimento**. Editora Contexto, São Paulo, 176p, 2002.

LI et al. Antibacterial characteristics and mechanisms of ϵ - poly-lysine against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v. 43, p. 22-27, 2014.

LIN, W-C. et al. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydrate polymers**, v.94, p. 603-611, 2013.

LIERSZENBAUM, A.L.; TRES, L.L. Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012, 704p.

LIMA, M.R.F.; LUNA, J.S.; SANTOS, A.F. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p.137-14, 2006.

LIMA, B.N.B. et al. Estudo do Amido de Farinhas Comerciais Comestíveis. **Polímeros**, v. 22, n. 5, p. 486-490, 2012.

LIU, P. et al. Thermal processing starch-based polymers. **Progress in polymer science**, v. 34, p. 1348-1368, 2009.

LÓPEZ-POSADAS, R. et al. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n.4, p. 495-506, 2008.

LUENGO, M. B. Uma revisão histórica dos principais acontecimentos da imunologia e da farmacologia na busca do entendimento e tratamento das doenças inflamatórias. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 64-72, 2005.

MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock**, 12 ed. São Paulo: Artmed, 2010.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 137-156, 2010.

MALI, S. et al. Mechanical and thermal properties of yam starch films. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 1, p. 157-164, 2005.

MALI, S., et al. Microstructural characterization of yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, n. 2, p. 379-386, 2002.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Effects of yam starch films on storability and quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p.7055-7011, 2003.

_____. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 56, n. 2, p. 129-135, 2004.

_____. Mechanical and thermal properties of yam starch films. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 1, p. 157-164, 2005.

_____. Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. **Journal of Food Engineering**, v. 75, n. 4, p. 453-460, 2006.

MALI, S. et al. Relationships among the composition and physicochemical properties of starches with the characteristics of their films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 25, p. 7720-7725, 2004b.

MALIZIA R.A. et al. Volatile Constituents of Leaf Oils from the Genus *Baccharis*. Part II: *Baccharis obovata* Hooker et Arnott and *B. salicifolia* (Ruiz et Pav.) Pers. Species from Argentina. **Journal Essential Oil Research**, v. 17, p. 194–197, 2005.

MARTINEZ-CORREA, H. A. et al. Extracts from the leaves of *Baccharis dracunculifolia* obtained by a combination of extraction processes with supercritical CO₂, ethanol and water. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 63, p. 31–39, 2012.

MELO, S.R.O. et al. Validação de métodos analíticos. In: VIEIRA, F.P.; REFIGUIERI, C..F.; REDIGUIERI, C.F. **A regulação de medicamentos no Brasil**. Porto Alegre: Artmed, 2013, 672p.

MENEZES, A.P. DA SILVA, J. et al. Genotoxic and biochemical changes in *Baccharis trimera* induced by coal contamination. **Ecotoxicology Environmental Safety**. v. 12, n. 114, p. 9-16, 2015.

MENDES, F. R.; TABACH, R.; CARLINI, E. A. Evaluation of *Baccharis trimera* and *Davilla rugosa* in tests for adaptogen activity. **Phytotherapy Research**, Chichester, v. 21, n. 6, p. 517-522, 2007.

MEYER, B. N. et al. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, p.31-34, 1982.

MI, F.L. et al. Control of wound infections using a bilayer chitosan wound dressing with sustainable antibiotic delivery. **Journal of Biomedical Material Research**, v.59, n.3, p.438-49, 2002.

MIDDLETON, E. JR.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological review**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MOHANTY, A. K. et al. Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites: An Introduction. In: Mohanty, A. K.; Misra, M.; Drzal, L. T. **Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005.

MOGAŞANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 463, p. 127-136, 2014.

MONGELLI, E. et al. In vitro antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Baccharis coridifolia* DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 58, p. 157-163, 1997.

MONKS, N. R. et al. *In vitro* citotoxicity of extracts from Brazilian Asteraceae. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 7, p. 494-500, 2002.

MONTANHER, A.B.P.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I.M.C. An Application of the Brine Shrimp Bioassay for General Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Acta Farm. Bonaerense**, v.21, n.3, p.175-178, 2002.

MORAIS, S.M. et al. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, p. 907-910, 2006.

MOREIRA, F. P.M. et al. Flavonóides e Triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia*: Bioatividade sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, v. 26, p. 309-311, 2003.

MÜLLER, J. **Systematics of *Baccharis* (Compositae - Astereae) in Bolivia, including an overview of the genus**. Systematic Botany Monographs, Michigan, v. 76, 2006.

MULLER, L. **Incorporação de óleo essencial de cravo em membrana de quitosana e avaliação da atividade cicatrizante e antimicrobiana**. 98 f. 2013. Dissertação (Mestrado em engenharia química) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

MÜLLER, C., LAURINDO, J., YAMASHITA, F. Evolution of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. **Carbohydrate Polymers**, v.72, p.82-87, 2008

MUSCHIETTI, L.V.; MARTINO, V.S. **Actividades biológicas de los flavonoides naturales**. In: química de produtos naturais novos fármacos e a moderna farmacognosia. YUNES, R. A.; FILHO, V.C. 5 ed. Itajaí: Univali, 2016, p. 217-256.

NAYAK, S.B. et al. Wound healing activity of the fruit skin of *Punica granatum*. **Journal of medicinal food**. v. 16. n. 9, p.857-861, 2013.

NAKASUGI, T.; KOMAI, K. Antimutagens in the Brazilian folk medicinal plant carqueja (*Baccharis trimera* Less.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 2560-2564, 1998.

NESOM, G.; ROBINSON, H. XV. Tribe Astereae Cass. In: Kadereit, J. W. & Jeffrey, C. (eds.). **The families and genera of vascular plants** (K. Kubitzki series editor), Vol. VIII. Flowering plants: Eudicots: Asterales. Springer, Berlin, p. 284-342, 2006.

OH, T.Y. et al. Oxidative damages are critical in pathogenesis of reflux esophagitis implication of antioxidants in its treatment. **Free Radical Bio Medical**, v.30, p.905-915, 2001.

OLIVEIRA, L.M. **Ensaio para avaliação de embalagens plásticas flexíveis**. Campinas: centro de Tecnologia de embalagem, CETEA, p. 219, 1996.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

OLIVEIRA, C. T. **Caracterização química, atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial de *Baccharis oreophila* Malme.** 59 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2016.

OLIVEIRA, P. F. et al. In vivo antigenotoxicity of Baccharin, an important constituent of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 109, p. 35–41, 2011.

OLIVEIRA, R. N. et al. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. **Experimental Parasitology**, v.132, p. 135–143, 2012.

OLIVEIRA, R. N. et al. Anthelmintic activity in vitro and in vivo of *Baccharis trimera* (Less) DC against immature and adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v.139, p. 63–72, 2014a.

OLIVEIRA, P. F. de LIMA. et al. Comparative evaluation of antiproliferative effects of brazilian green propolis, its main source *Baccharis dracunculifolia*, and their major constituents Artepillin C and Baccharin. **Planta Medica**, v. 80, n. 6, p. 490-492, 2014b.

OLIVEIRA, V.B. et al. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, Dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, n.1, p.230-239, 2016.

OLIVEIRA, T.G. **Caracterização de filmes à base de gelatina aditivados com extratos vegetais.** 2017. 122 f. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Pirassununga, 2017.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PÁDUA, B. da C. et al. Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 381–386, 2010.

PAPARELLA, S.; VALLEY, H. Transdermal patches: an unseen risk for harm. **Journal of Emergency Nursing**, v.31, n.3, p. 278-281, 2005.

PASSERO, L. F. D. et al. Anti-leishmanial effects of purified compounds from aerial parts of *Baccharis uncinella* C. DC. (Asteraceae). **Parasitology Research**, v. 108, p. 536, 2011.

PARREIRA, N. A. et al. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry Biodiversity** v. 7, n. 4, p. 993-1001, 2010.

PATEL, K.; PATEL, D.K. Medicinal importance, pharmacological activities, and analytical aspects of hispidulin: A concise report. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v.7, n.3, p.360-366, 2016.

PAUL, E. L. et al. Anti-inflammatory and Immunomodulatory Effects of *Baccharis trimera* Aqueous Extract on Induced Pleurisy in Rats and Lymphoproliferation In Vitro. **Inflammation**, v. 32, n. 6, p. 419-425, 2009.

PAVLOVIC, S.; BRANDAO, P.R. Adsorption of starch, amylose, amylopectin and glucose monomer and their effect on the flotation of hematite and quartz. **Minerals Engineering**, v.6, n.11, p.1117-1122, 2003.

PEREIRA, C.B. et al. Chemical composition and biological activities of *Baccharis milleflora* essential oil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.35, 2225-2233, 2016.

PETROBRÁS Normas Técnicas. **Norma técnica N-2588**. Determinação da toxicidade aguda de agentes tóxicos em relação à *Artemiasp.*, 1996.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p.337-341, 1999.

QUEIROGA, C. L.; FERRACINI, V. L.; MARSAIOLI, A. J. Three new oxygenates cadinanes from *Baccharis* species. **Phytochemistry**, v. 42, n. 4, p. 1097-1103, 1996.

RABELO, M. **Aditivção de polímeros**. São Paulo: Editora Artlibler, 2000, 242p.

RANAA, V. et al. Modified gums: Approaches and applications in drug delivery. **Carbohydrate Polymers**. v. 83, p. 1031-1047, 2011.

RAY, S. S.; BOUSMINA, M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. **Progress in Materials Science**, v. 50, n. 8, p. 962-1079, 2005.

REZENDE, T. P. et al. Protective Effects of *Baccharis dracunculifolia* Leaves Extract against Carbon Tetrachloride- and Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Experimental Animals. **Molecules**, v. 19, p. 9257-9272, 2014.

RODRÍGUEZ, M. de las. N. **Estudio de la capacidad antimutagénica del extracto acuoso de *Baccharis articulata* (Lam.) Persson**. 205f. (Tese de doutorado em Ciências Naturais) Universidad Nacional de La Plata Facultad de Ciencias Naturales y Museo. 2013.

ROMÃO, B.M.V. et al. Caracterização por FT-IR de Agentes de Cura Utilizados em Resinas Epoxídicas-II-Polimercaptana, Poliaminoamida e Amina Modificada. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 3, p. 173-180, 2003.

ROSA, M. B. et al. Estudo espectrofotométrico da atividade fotoprotetora de extratos aquosos de *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea* var. capitata, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass e *Sonchus oleraceus*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n.1, p. 101-110, 2008.

ROSA, D. S. et al. Avaliação da Biodegradação de Poli- β -(Hidroxibutirato), Poli- β -(Hidroxibutirato-co-valerato) e Poli- ϵ -(caprolactona) em Solo Compostado. **Polímeros**, v.12, p.311, 2002.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v.92, p.235–254, 2005.

SALGADO, A.J. et al. Preliminary study on the adhesion and proliferation of human osteoblasts on starchbased scaffolds. **Material Science & Engineering**, v. 20, p. 27-33. 2002.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F.A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 270-276, 1998.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L. et al. **Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades**. 1 ed. Campinas: CETEA/ITAL, 2002, 267p.

SANTOS, U. et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v. 13, n.4, p. 242-249, 2003.

SANTOS, S.C. et al. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p. 215-219, 2007.

SANTOS, L.M.O et al. Análise de amostras de flores de *Calêndula* (*Calendula officinalis* L., Asteraceae) comercializadas na grande Curitiba. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.36, p.251- 258, 2015.

SANTOS, F.H.P. et al. Avaliação antibacteriana dos extratos hexânico e metanólico de própolis vermelha encontrada no município Barra de Santo Antônio/AL. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 2, n.3, p. 33-44, 2015.

SARTOR, T. et al. Seasonal changes in phenolic compounds and in the biological activities of *Baccharis dentata* (Vell.) G.M. Barroso. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 355– 359, 2013.

SILVA, F. G. et al. Teor de flavonóides em populações silvestres e cultivadas de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.)DC.] coletadas nas estações seca e úmida. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n. 2, p. 19-25, 2006.

SILVA, G. A. et al. Synthesis and evaluation of novel bioactive composite starch/bioactive glass microparticles. **Journal Biomedical Material Research**, v.70 p. 442-49. 2004.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SIMÕES-PIRES, C. A. et al. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach, **Plant Systematics and Evolution**, v. 253, p. 23–32, 2005.

SIRIPATRAWANA, U.; HARTEB, B.R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p.770-775, 2010.

SHIMAZU, A. A.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. **Semina Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 79 – 88, 2007.

SOBRAL, P. J. A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.6, p. 1251-1259., 2000.

SOBRAL, P. J. A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 6, p. 1-14, 2000a.

Proteínas de origem animal na tecnologia de biofilmes. 2000b. 156p. Tese (Tese de Livre Docência) – Universidade de São Paulo. Pirassununga.

SOBRINHO et al. Chemical composition, antioxidant, antifungal and hemolytic activities of essential oil from *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. (Asteraceae). **Industrial Crops and Products**. v. 84, p.108-115, 2016.

SOICKE, H.; LENG-PESCHLOW, E. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their anti-hepatotoxic properties. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 53, p. 37-39, 1987.

SOSA, M.E et al. Insecticidal and nematicidal essential oils from Argentinean Eupatorium and *Baccharis* spp. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 43, p.132–138, 2012.

SOUZA, C. O. D.; SILVA, L. T.; DRUZIAN, J. I. Estudo comparativo da caracterização de filmes biodegradáveis de amido de mandioca contendo polpa de manga e acerola. **Química Nova**, v. 35, n. 02, p. 262-267, 2012.

SOUZA, F.P., CAMPOS, G. R.D, PACKER, J.F. Determinação da atividade fotoprotetora e antioxidante em emulsões contendo extrato de *Malpighia glabra* L. – Acerola. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.34, n.1, p.69-77, 2013.

SOUZA, S. P. et al. Estudo da atividade antiobesidade do extrato metanólico de *Baccharis trimera* (Less.) DC. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.1, n. 93, p. 27-32, 2012.

SUEIRO, A.C. et al. Filmes biodegradáveis de amido de mandioca, pululana e celulose bacteriana. **Química Nova**, v. 39, n. 9, p.1059-1064, 2016.

SUHONEN, T. M., BOUWSTRA J. A., URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural. **J. Control. Rel.**, v.59, p. 149–161, 1999.

TAPIA, A. et al. Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 2-3, n. 95, p.155-61, 2004.

TAUFNER C.F; FERRAÇO, E.B; RIBEIRO, L.F Uso de plantas medicinais como alternativa fitoterápica nas unidades de saúde pública de Santa Teresa e Marilândia, ES. **Natureza on line**,v. 4, n. 1, p. 30-39, 2006.

TEIXEIRA, H. F.; BASSANI, V. L. Avaliação da influência de adjuvantes farmacêuticos sobre características físicas, químicas, tecnológicas e farmacológicas de extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.-Compositae-Marcela. **Caderno de Farmácia**, v. 13, n. 2, p. 151-152, 2007.

TESTER, F. R.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch-composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, p. 151-161, 2004.

THAIPONG, K. et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 669-675, 2006.

THE ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. **Electronic Supplementary Material (ESI) for RSC Advances**.2016.

THIRÉ, R. M.S.M. et al. Redução da Hidrofilicidade de Filmes Biodegradáveis à Base de Amido por meio de Polimerização por Plasma. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 4, n.1, p. 57-62, 2004.

THITILERTDECHA, P.; ROWAN, M.G.; GUY, R.H. Topical formulation and dermal delivery of active phenolic compounds in the Thai medicinal plant--*Clerodendrum petasites* S. Moore. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 1, p. 39-45, 2015.

TOLEDO, A. C. et al. Flavonone treatment reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. **British Journal of Pharmacology**, v.168, p. 1736–1749, 2013.

TRES, L.L.; KIERSZENBAUM, A.L. **Histologia e Biologia Celular - Uma Introdução à Patologia**. 3ª Ed. 2012.

USP (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA).25th ed. Rockville: **United States Pharmacopeial Convention**. 2002.

VALENTA, C.; AUNER, B.G. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 279-89, 2002.

VAN SOEST, J. J. G; VLIEGENTHART LIEGENTHART, J. F. G. Crystallinity in starch plastics: consequences for material properties. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 208- 213, 1997.

VAN ACKER, S.A. et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology Medicine**.v.20, n.3, p. 331-42, 1996.

VASCONCELOS, E.A.F. et al. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil®200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.3, p. 243-249, 2005.

VASQUES, C. T. **Preparação e caracterização de filmes poliméricos a base de amido de milho e polipirrol para aplicação como biomaterial**. 140f. 2007. Tese. (doutorado). Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

VENTURI, C.R. et al. Chemical analysis and antiviral activity evaluation of *Baccharis anomala*. **Natural Product Research**.v.32, n.16, p.1960-1962, 2018.

VEITCH, N. C.; GRAYER, R. E. J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. **Natural Product Reports**, v. 25, n. 3, p. 555-611, 2008.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (ASTERACEAE): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VIEIRA, T. O. et al. Antioxidant effects of crude extracts from *Baccharis* species: inhibition of myeloperoxidase activity, protection against lipid peroxidation, and action as oxidative species scavenger. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 601-607, 2011.

VILLANOVA, J.C.O.; ORÉFICE, R.L. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n.1, p. 51-64, 2010.

VIOLANTE, I.M.P. et al. Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n. 2A, p.452-457, 2009.

VODNAR, D.C. Inhibition of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 on ham steak by tea bioactive compound incorporated into chitosan-coated plastic films. **Chemistry Central Journal**, v.74, n.6, p. 1-6, 2012.

VON GADOW A.; JOUBERT E.; HANSMANN, C.F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), x-tocopherol, BHT, and BHA. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.45, n.632-638, 1997.

VOWDEN, K.; VOWDEN, P. Wound dressings: principles and practice. **Surgery**, v. 32, p. 462-467, 2014.

ZALEWSKI, C. A. et al. Evaluation of anti inflammatory activity of derivatives from aerial parts of *Baccharis uncinella*. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, p. 602-607, 2011.

ZAPATA, B. et al. Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.27, n.2, p.101–103, 2010.

ZAVAREZE, E. da R. et al. Development of oxidised and heat– moisture treated potato starch film. **Food Chemistry**, v. 132, n. 01, p. 344–350, 2012.

ZHANG, Y.; HAN, J.H. Plasticization of pea starch films with monosaccharides and polyols. **Journal of food science**, v.71, p. 253-261, 2006.

ZHANG, Y. et al. A novel agar diffusion assay for qualitative and quantitative estimation of ϵ - polylysine in fermentation broths and foods. **Food Research International**, v. 48, p. 49-56, 2012.

ZIELINSKI, A. A. F. et al. A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Research International**, v. 60, p. 246-254, 2014.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A.; ZUCULOTTO, S.M. **Flavonoides**. In: Farmacognosia do produto natural ao medicamento. SIMÕES, C.M.O.; SCHENEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Porto Alegre: Artmed, 2017, 209p.

WANG, L. et al. Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. **Food Hydrocolloids**, v. 32, p.35-41, 2013.

WENDLANDT, W.W. **Thermal analysis**. 3.ed. New York: John Wiley & Sons. 1986.

WOLKERS, W. F. A Fourier-transform infrared spectroscopy study of sugar glasses. **Carbohydrate Research**, v.339, n.6, p.1077–1085, 2004.

YAMASAKI, K. et al. Electrochemical method for estimating the antioxidative effect of methanol extracts of crude drugs. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n.8, p.1663-1665, 1994.

YEN, G.C.; CHEN, H.Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **J. Agric Food Chem.**, v.43, p.27-32, 1995.

YOON, J. H.; BAEK, S. J. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. **Yonsei Medical Journal**. v. 46, n.30, p. 585-596, 2005.

YOKOZAWA, T. et al. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2 picrylhydrazyl radical. **Biochem Pharmacol.** v.15, n.56, p. 213-22, 1998.

YUTING, C. et al. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. **Free radical biology & medicine**, v.9, p. 19-21, 2003.

ANEXOS

ANEXO 1 - AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO REALIZADA DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO CGEN Nº35, DE 27 DE ABRIL DE 2011 Nº 03/2014

O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 40, de 24 de setembro de 2003, para autorizar instituição nacional, pública ou privada, que exerça atividade de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, **autoriza** com amparo na Resolução CGEN nº 35, de 27 de abril de 2011, que dispõe sobre regularização de atividades de acesso ao patrimônio genético e/ou ao conhecimento tradicional associado e sua exploração econômica realizadas em desacordo com a Medida Provisória no 2.186-16, de 23 de agosto de 2001 e demais normas, **as atividades de acesso ao patrimônio genético desenvolvidas pela:**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, CNPJ/MF nº. 75.095.679/0001-49, situada na Rua XV de Novembro, 1299, Curitiba-PR, CEP: 80060-000, e representada na pessoa do Reitor Zaki Akel Sobrinho, RG nº. 1.439.536-9 SSP/PR, CPF nº. 359.063.759-53, no âmbito das atividades do projeto de pesquisa "*Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais*".

Objetivo da Autorização: Avaliar sob aspecto morfoanatômico, químico e biológico das espécies acessadas constantes do projeto de pesquisa.

Período das atividades: 2000 a 2019.

Validade da Autorização: Cinco anos, contados da assinatura. Em razão da continuidade do projeto de pesquisa, a instituição detentora desta autorização deverá enviar ao Ibama, a partir da emissão da licença, **relatório anual** sobre a execução das atividades de pesquisa, nos termos do Decreto nº 4.946/2003 e Resolução CGEN nº 41/2013. Endereço para envio do relatório: IBAMA/DBFLO, SCEN L4 Norte, Bloco B, Brasília-DF, CEP: 70818-900.

Esta autorização das atividades de acesso está vinculada às informações e termos assinados pelo requerente, constantes do processo nº 02001.001165/2013-47.

Volney Zanardi Junior
Presidente

Brasília, 17 de março de 2014.

ANEXO 2 – CARTA DE ACEITE DO ARTIGO

**ACCEPTANCE CERTIFICATE – BJPS**

The BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES (BJPS) certificate that your manuscript BJPS-2019-0118 entitled "Chemical composition and biological activity of *Baccharis eriodlada* DC. essential oil" was accepted for publication. Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Thank you very much. I look forward to hearing back from you soon.

August 26, 2019.

Best regards,

A handwritten signature in dark ink that reads 'Antonio Marcos Amorim'.

Antonio Marcos Amorim

Editorial Manager
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences